

**Recherche de plantes de services pour la
gestion du flétrissement bactérien causé par
Ralstonia solanacearum :**

**ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU
STATUT HÔTE ET DU POUVOIR
BACTÉRICIDE D'ESPÈCES
VÉGÉTALES CANDIDATES**

GROSHENS ÉVA

Rapport de stage long au Cirad-PRAM de la Martinique
15 juin - 15 décembre 2009

Maître de stage
DEBERDT PÉNINNA

Enseignant tuteur
NEEMA CLAIRE



SOMMAIRE GÉNÉRAL

SOMMAIRE GÉNÉRAL.....	2
<u>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</u>	<u>3</u>
<u>LUTTER CONTRE RALSTONIA SOLANACEARUM,.....</u>	<u>4</u>
<u>UN ENJEU POUR LA MARTINIQUE.....</u>	<u>4</u>
INTRODUCTION.....	5
SOMMAIRE.....	5
I] R. SOLANACEARUM ET LE FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN.....	6
II] STRATÉGIES DE LUTTE : VERS LA PROTECTION INTÉGRÉE.....	9
III] ENJEUX POUR LA CULTURE DE TOMATE À LA MARTINIQUE.....	11
IV] UNE LUTTE PAR L'AGROÉCOLOGIE EN CLIMAT TROPICAL ?.....	12
<u>ÉVALUATION DU STATUT</u>	<u>14</u>
<u>HÔTE / NON-HÔTE DE DIVERSES ESPÈCES VÉGÉTALES VIS-À-VIS DE RALSTONIA SOLANACEARUM.....</u>	<u>14</u>
INTRODUCTION.....	15
SOMMAIRE.....	15
I] MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	16
II] RÉSULTATS.....	19
III] DISCUSSION.....	21
<u>ÉVALUATION IN VITRO DE L'EFFET ANTIBACTÉRIEN D'EXTRAITS VÉGÉTAUX SUR LA CROISSANCE DE RALSTONIA SOLANACEARUM.....</u>	<u>22</u>
INTRODUCTION.....	23
SOMMAIRE.....	23
I] LES EFFETS BIOCIDES DES EXTRAITS VÉGÉTAUX.....	24
II] MISE AU POINT DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.....	25
III] ÉTUDE DE L'EFFET ANTIBACTÉRIEN DES EXTRAITS VÉGÉTAUX.....	30
DISCUSSION.....	34
<u>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</u>	<u>36</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE ET ANNEXES.....</u>	<u>37</u>
TABLE DES ANNEXES.....	38
ICONOGRAPHIE.....	38
BIBLIOGRAPHIE.....	39
ANNEXE 1 - MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS.....	41
ANNEXE 2 - TECHNIQUES BACTÉRIOLOGIQUES UTILISÉES.....	42
ANNEXE 3 - STATUT HÔTE / NON HÔTE : PLAN DU DISPOSITIF.....	43
ANNEXE 4 - SOL RHIZOSPHÉRIQUE : ANALYSE STATISTIQUE.....	44
ANNEXE 5 - TIGE ET RACINE : ANALYSE STATISTIQUE.....	46
ANNEXE 6 - LISTE DES EXTRAITS VÉGÉTAUX.....	48
ANNEXE 7 - PROTOCOLE DE MANIPULATION.....	50
ANNEXE 8 - EXTRAITS VÉGÉTAUX : FICHE DE MANIPULATION.....	52
ANNEXE 9 - COURBES DE SURVIE.....	53

INTRODUCTION GÉNÉRALE



Ralstonia solanacearum, l'agent du flétrissement bactérien, est un phytopathogène qui cause des dégâts considérables sur les cultures maraîchères à l'échelle mondiale. Il s'attaque à plus de cinquante familles de plantes dont la principale lui donne son nom : c'est la famille des solanacées, qui comprend de nombreuses espèces d'importances alimentaires et économique majeures : la pomme de terre, la tomate et le tabac en sont les exemples les plus flagrants. En Martinique notamment, *Ralstonia solanacearum* provoque d'importantes pertes agricoles sur cultures maraîchères.

Dans le contexte de la démarche d'intensification écologique engagée par le PRAM (Pôle de Recherche Agro-environnementale de la Martinique, regroupant Cirad, Cemagref et IRD), l'équipe de phytopathologie du Cirad qui m'a accueillie participe à un projet de recherche visant à exploiter l'introduction de plantes de services dans les systèmes de culture pour la gestion du flétrissement bactérien de la tomate.

Mon stage participe ainsi à une première phase de sélection de plantes de services selon trois critères : leur statut non hôte vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum*, leur aptitude à ne pas multiplier la bactérie dans le sol, et enfin les effets antibactériens *in vitro* de leurs extraits aqueux, vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum*.

Un premier chapitre de ce rapport apporte une description de *Ralstonia solanacearum* et du flétrissement bactérien qu'il provoque, situe brièvement la maladie dans le contexte de la culture de la tomate en Martinique, et introduit le projet dans lequel s'inscrit mon stage.

Les deux chapitres suivants présentent les deux études que nous avons réalisées pendant ces six mois.

La première étude, réalisée en chambre climatique, regroupe l'évaluation du statut hôte / non hôte des espèces végétales candidates, et l'évaluation de la multiplication de la bactérie dans le sol rhizosphérique de chaque espèce.

La seconde étude, qui a demandé la mise au point d'un nouveau protocole, offre une évaluation *in vitro* de l'effet antibactérien d'extraits aqueux végétaux de différentes espèces végétales vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum*.



- Chapitre 1 -

LUTTER CONTRE *RALSTONIA* *SOLANACEARUM*, UN ENJEU MAJEUR POUR LA MARTINIQUE

INTRODUCTION

Ralstonia solanacearum est un agent pathogène tellurique qui inquiète, en Martinique comme ailleurs. Avant de présenter les deux études réalisées, nous allons d'abord introduire ce pathogène et les méthodes de lutttes qui peuvent être employées contre le flétrissement bactérien. Nous ferons ensuite un bref exposé des enjeux pour la culture de la tomate en Martinique, avant de présenter le projet du Cirad dans lequel s'inscrit mon stage.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	5
SOMMAIRE.....	5
I] R. SOLANACEARUM ET LE FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN.....	6
A) CLASSIFICATION ET VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE.....	6
B) SPECTRE D'HÔTES.....	6
C) ÉPIDÉMIOLOGIE.....	6
1 - INFECTION ET SYMPTÔMES CHEZ LA TOMATE.....	6
2 - DISSÉMINATION.....	7
3 - PERSISTANCE ENTRE DEUX CULTURES SENSIBLES.....	7
D) LE CAS PARTICULIER DE L'INFECTION LATENTE.....	7
E) INFLUENCE DE DIFFÉRENTS PARAMÈTRES BIOTIQUES ET ABIOTIQUES.....	8
1-TEMPÉRATURE ET INTENSITÉ LUMINEUSE.....	8
2-HUMIDITÉ ET TYPE DE SOL.....	8
4-POPULATION DE NÉMATODES.....	8
5 - LA FORTE SENSIBILITÉ DES ZONES TROPICALES.....	8
F) CONCLUSION : UN AGENT PATHOGÈNE QUI INQUIÈTE.....	8
II] STRATÉGIES DE LUTTE : VERS LA PROTECTION INTÉGRÉE.....	9
A) DES TECHNIQUES NOMBREUSES MAIS INSUFFISANTES.....	9
1 - L'INTERDICTION DE LA LUTTE CHIMIQUE.....	9
2 - RÉSISTANCE ET TOLÉRANCE VARIÉTALE.....	9
3 - PROPHYLAXIE.....	9
4 - AMENDEMENTS DU SOL.....	9
5 - POTENTIEL ASSAINISSANT DES ROTATIONS ET ASSOCIATIONS.....	9
6 - LUTTE BIOLOGIQUE.....	10
B) LES PERSPECTIVES DE LA PROTECTION INTÉGRÉE.....	10
III] ENJEUX POUR LA CULTURE DE TOMATE À LA MARTINIQUE.....	11
A) IMPORTANCE DE LA CULTURE MARAÎCHÈRE À LA MARTINIQUE.....	11
B) INCIDENCE DU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN SUR TOMATE À LA MARTINIQUE.....	11
IV] UNE LUTTE PAR L'AGROÉCOLOGIE EN CLIMAT TROPICAL ?.....	12
A) DÉFINITION DE L'AGROÉCOLOGIE.....	12
B) LE PROJET OMEGA3.....	12
C) L'OBJET DE MON STAGE : LA RECHERCHE DE PLANTES DE SERVICE.....	13
1 - ÉVALUATION DU STATUT HÔTE / NON HÔTE.....	13
2 - ÉTUDE DU POTENTIEL ALLÉLOPATHIQUE DES PLANTES CANDIDATES.....	13

I] *R. SOLANACEARUM* ET LE FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN

Nous nous inspirons dans cette partie de la méta-analyse réalisés par HAYWARD en 1991.

A) Classification et variabilité génétique

Ralstonia solanacearum est l'agent du flétrissement bactérien. Il s'agit d'un bacille Gram négatif de la classe des Betaprotéobactéries. On le retrouve également sous les noms obsolètes de *Pseudomonas solanacearum*, *Bacillus solanacearum* et *Burkholderia solanacearum*.

La classification des différentes souches de *R. solanacearum* est maintenant basée sur les phylotypes.

Les sous-espèces présentes à la Martinique (figure 1) sont les phylotypes I et II (populations « naturelles ») et le phylotype II seq4NP, population émergente de la Martinique (WICKER *et al*, 2005). La souche bactérienne que nous avons étudiée au cours de ce stage fait partie de cette population émergente.

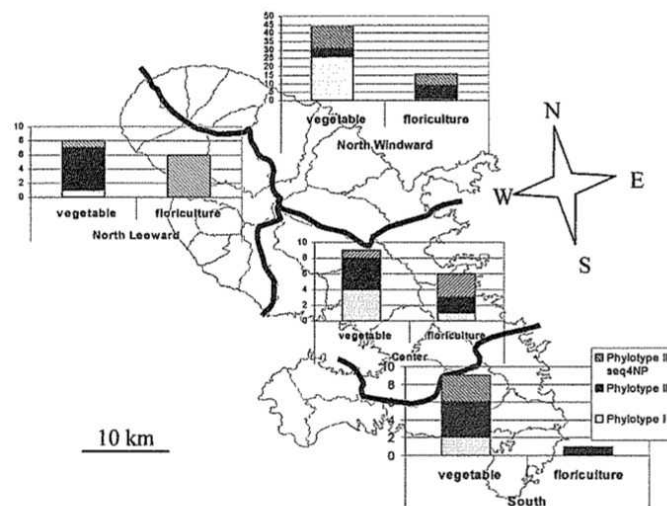


Figure 1 : Populations de *R. solanacearum* de la Martinique (WICKER *et al*, 2005)

B) Spectre d'hôtes

Ce pathogène a un très large spectre d'hôtes : plus de 200 espèces réparties dans une cinquantaine de familles sont sensibles à au moins l'un des phylotypes de *R. solanacearum*. Les plus importantes à l'échelle mondiale sont la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et le tabac (*Nicotiana tabacum*).

C) Épidémiologie

1 - Infection et symptômes chez la tomate

Ralstonia solanacearum infecte ses hôtes par les blessures des racines, colonise alors les vaisseaux du xylème du système racinaire, puis remonte dans la plante entière, conduisant à une infection systémique.

Sous un climat chaud et humide, on observe chez la tomate, dès 5 à 10 jours après infection, le flétrissement des jeunes feuilles aux périodes les plus chaudes de la journée. 2 à 3 jours plus tard, la plante est totalement flétrie (Figure 2 ci-contre)

Le flétrissement est irréversible et conduit à la mort de la plante.

2 - Dissémination

Ralstonia solanacearum se dissémine par différents moyens, au sein de la parcelle comme à l'échelle régionale et internationale :

- **L'eau** : C'est l'un des principaux vecteurs de contamination, la maladie peut en effet se répandre lors de fortes pluies, ou par voie d'irrigation (retenues contaminées).
- **Effet splash** : Il permet la dissémination de la maladie de sol à plante et de plante à plante (survie épiphyte) lors de fortes pluies.
- **De racine à racine** : pour des plants suffisamment proches
- **Matériel végétal** : les tubercules, les rhizomes et les semences sont d'importants vecteurs
- **Outillage agricole contaminé**
- **Insectes et parasites telluriques** : les piqures peuvent transmettre le pathogène ou au moins en faciliter l'entrée.



Figure 2: Plant de tomate sain (à gauche) et flétri (à droite)
(photo : laboratoire de phytopathologie du PRAM)

3 - Persistance entre deux cultures sensibles

Ralstonia solanacearum peut, sous des conditions climatiques favorables, se maintenir dans le sol, en l'absence de culture sensible : Le pathogène persiste dans les couches profondes du sol (figure 3), dans les débris végétaux, dans la rhizosphère des plantes adventices hôtes, et également à l'état latent dans des plantes porteuses saines.



Figure 3: Persistance de *Ralstonia solanacearum* dans les couches profondes du sol

D) Le cas particulier de l'infection latente

Certains plants apparaissant sains peuvent en réalité être des hôtes de la bactérie à l'état latent. C'est par exemple le cas pour certains cultivars qui sont tolérants pour de faibles températures, et ne déclarent la maladie qu'à partir de températures plus élevées.

L'existence de cette forme latente d'infection pose un double problème : elle contribue non seulement à maintenir la maladie dans les parcelles (plantes adventices hôte), mais aussi à disséminer la bactérie par l'échange de semences apparemment saines mais en réalité contaminées.

Cela a conduit à l'élaboration d'une nouvelle définition du statut hôte / non hôte de la plante, selon les organes infectés par *R. solanacearum* (ALVAREZ *et al*, 2008) :

- *hôte susceptible* : xylème racinaire (+++) et xylème mi-tige (++)
- *hôte tolérant* : xylème racinaire (+++) et xylème mi-tige (-)
- *non hôte* : xylème racinaire et mi-tige (-), même si cortex (±) rhizosphère (±)

E) Influence de différents paramètres biotiques et abiotiques

1-Température et intensité lumineuse

La température est dans le cas de *Ralstonia solanacearum* le facteur principal affectant la relation hôte - pathogène. Globalement, elle augmente l'incidence de la maladie, mais peut conduire au contraire, pour de plus hautes températures, à la mort de certaines souches (technique de solarisation).

L'augmentation de l'intensité lumineuse fait de plus baisser la résistance de la plante, pour de hautes températures seulement, tandis qu'une photopériode allongée fait augmenter la résistance de la plante, indépendamment de la température.

2-Type de sol et humidité

Ralstonia solanacearum présente une grande sensibilité au type de sol : certains sols ne sont jamais soumis à la maladie, et sont appelés « sols suppressifs ». De façon générale mais pas systématique, les sols argileux sont plus sensibles à la maladie, et *Ralstonia solanacearum* se développe mieux dans des sols humides que dans des sols secs.

4-Population de nématodes

Une corrélation positive entre la présence de nématodes et l'infection par *Ralstonia solanacearum* a été observée : une hypothèse serait que les blessures causées par les nématodes forment autant de portes d'entrée de la bactérie dans la plante.

5 - La forte sensibilité des zones tropicales

Le climat tropical est particulièrement sensible au développement de maladies telluriques :

- la chaleur et l'humidité sont favorables aux pathogènes en général, et à *Ralstonia solanacearum* en particulier,
- les sols ne bénéficient pas du rôle assainissant de l'hiver des régions tempérées (froid sec),
- il permet souvent de continuer une même culture tout au long de l'année, ce qui n'incite pas à l'introduction de rotations assainissantes.

L'incidence de *Ralstonia solanacearum* est ainsi globalement encore plus importante en climat tropical qu'en climat tempéré.

F) Conclusion : un agent pathogène qui inquiète

Le pouvoir pathogène de *Ralstonia solanacearum*, l'importance de son spectre d'hôtes comprenant notamment des espèces d'importance alimentaire économique majeure, et sa bonne capacité de dissémination et d'adaptation font de cette bactérie un pathogène très dangereux. C'est ainsi que *R. solanacearum* est en France un agent de quarantaine, et est aux États Unis d'Amérique référencé comme agent du bioterrorisme.

Le flétrissement bactérien constitue donc sinon une menace, du moins un important frein à la production dans des systèmes agricoles et des régions très diverses, de l'openfield de pomme de terre américain au jardin créole martiniquais.

II] STRATÉGIES DE LUTTE : VERS LA PROTECTION INTÉGRÉE

A) Des techniques nombreuses mais insuffisantes

1 - L'interdiction de la lutte chimique

Le bromure de méthyle était couramment utilisé comme fumigant à large spectre contre les maladies telluriques, dont *Ralstonia solanacearum*. Son effet destructeur sur la couche d'ozone a conduit à son interdiction en 2005 dans la plupart des pays développés, suite au protocole de Montréal de 1997. Notons qu'il est toujours utilisé en France, mais soumis à des quotas.

2 - Résistance et tolérance variétale

La recherche de variétés résistantes au flétrissement bactérien est actuellement la méthode de lutte la plus employée contre *Ralstonia solanacearum*. Cependant, malgré quelques succès chez le tabac et l'arachide, la résistance chez la tomate n'a été trouvée que pour certains environnements donnés, et ne donne pas de résultats durables. La résistance est de plus polygénique, et dépend des conditions environnementales (température).

Le Cirad - PRAM mène par ailleurs des essais de criblage variétal vis-à-vis de la population émergente de *R. solanacearum* de la Martinique, sur tomate, aubergine et poivron (essai TAP, figure 4).



Figure 4: Essai TAP : sélection de cultivars résistants par le Cirad-PRAM
(Photo : laboratoire de phytopathologie)

3 - Prophylaxie

La prophylaxie regroupe l'ensemble des méthodes utilisées pour prévenir l'apparition ou le développement de la maladie : l'utilisation de semences saines, de variétés tolérantes, la plantation à faible densité, le drainage des eaux d'irrigation, la désinfection des outils, l'arrachage des plants malades, sont autant de moyens efficaces de prévention.

4 - Amendements du sol

- Certains **amendements minéraux** du sol ont été conçus pour réduire l'incidence de pathogènes telluriques.
- Les **amendements organiques**, généralement utilisés pour améliorer les propriétés physiques et chimiques du sol, ont également un rôle positif dans la suppressivité du sol. Cet effet serait dû à la stimulation globale de la biomasse microbienne, ce qui renforce la stabilité de l'écosystème du sol, le rendant moins vulnérable à l'invasion par un pathogène. Une étude de CARDOSO *et al* (2006) montre par exemple que l'enfouissement des parties aériennes de pois d'angole et d'une crotalaire montre conjointement une augmentation de l'activité bactérienne des sols et une diminution de l'incidence du flétrissement bactérien de la tomate.

5 - Potentiel assainissant des rotations et associations

L'introduction de diversité végétale dans les agrosystèmes offre un moyen d'exploiter au mieux les propriétés des plantes. Ces propriétés peuvent s'exprimer en phase de culture ou en phase d'enfouissement. Il existe deux grands schémas d'associations d'espèces : la rotation et l'association.

a. La rotation culturale : association dans le temps

- **L'alternance de cultures commerciales différentes** (dicotylédon / monocotylédon, légumineuse / céréale) est couramment utilisée en agriculture, notamment pour son intérêt sanitaire. Dans le cas de *Ralstonia solanacearum*, la rotation des cultures sensibles avec des cultures non hôte est efficace. Cependant, ce type de rotation demande plusieurs années de culture pour obtenir un effet assainissant suffisant.
- L'introduction d'**intercultures assainissantes** faisant intervenir des plantes alors dites « plantes de services » (qui ne comportent pas d'intérêt commercial direct) donne de bons résultats et suscite de plus en plus d'intérêt : la plante de services est alors partiellement ou totalement enfouie, selon l'effet recherché. La **biofumigation** en est un bon exemple : les plantes des familles des alliées et des brassicacées (crucifères) libèrent des molécules volatiles toxiques après enfouissement, lors de leur décomposition dans le sol (MICHEL *et al*, 2007).

b. L'association culturale : utiliser la diversité spatiale

La culture simultanée au sein d'une même parcelle de plantes différentes peut permettre de limiter l'incidence des pathologies végétales. Une plante non hôte vis-à-vis d'un pathogène donné implantée entre des plants sensibles à cette même maladie peut alors se comporter comme :

- **Barrière physique** : l'association éloigne physiquement les plants d'une même variété, et limite ainsi la transmission d'un agent pathogène plante à plante.

- **Barrière allélopathique** : les exsudats racinaires libérés par certaines plantes pendant la phase de culture peuvent présenter une toxicité pour le pathogène, et réduire son développement dans le sol. Il a par exemple été montré en serre que l'association avec l'œillet d'Inde (*Tagetes patula*) empêchait l'expression du flétrissement bactérien chez le tabac, et que la plantation d'œillet d'Inde permettait de réduire de plus de 1000 fois la population de *R. solanacearum* dans le sol (TERBLANCHE, 2007).

6 - Lutte biologique

La stimulation ou l'introduction de microorganismes peut être un moyen efficace de lutte contre un pathogène tellurique :

- Des microorganismes symbiotiques de la biosphère peuvent renforcer la plante, et former une barrière physique ou chimique à l'infection.
- Des microorganismes antagonistes ou des mutants avirulents peuvent occuper la niche recherchée par le pathogène et ainsi limiter par compétition les risques d'infection.

Dans le cadre précis de la lutte contre *R. solanacearum*, il existe bien des souches avirulentes, mais celles-ci se sont montrées non compétitives *in vivo*.

B) Les perspectives de la protection intégrée

La protection intégrée permet de combiner les différentes techniques évoquées précédemment, pour obtenir les meilleurs résultats possibles en terme de protection durable des cultures et de respect de l'environnement.

Il a par exemple été élaboré une échelle de notation des pratiques de protection, afin d'évaluer si une combinaison de pratiques est ou non suffisante pour se préserver du flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* (Tableau 1 : FRENCH, 1997)

Tableau 1: **Tableau d'aide à la décision** : Une note a été attribuée à chaque méthode de lutte. L'efficacité combinaison de plusieurs méthode est alors évaluée par la somme des notes. Une note totale supérieure ou égale à 10 garantirait, d'après French, un bon contrôle du flétrissement bactérien.

- Sol sans <i>Ralstonia solanacearum</i>	7
- Fumigation	5
- Sols suppressifs	4
- Rotation courte	
- Arrachage des plantes spontanées	
- Résistance tolérance	3
- Semences saines	
- Intercultures	
- Date de plantation	
- Climat froid	2
- Contrôle de la contamination par l'eau	
- Lutte / résistance contre les nématodes	
- Assèchement / chauffage des sols	
- Arrachage des plantes flétries	
- Désinfection des outils et équipements	
- Solarisation	1
- Travail simplifié du sol	
- Amendements du sol	

III] ENJEUX POUR LA CULTURE DE TOMATE À LA MARTINIQUE

A) Importance de la culture maraîchère à la Martinique

La production de légumes frais représente, dans les comptes agricoles de 2008, 34 % de la production agricole totale de la Martinique (Statistiques agricoles Agreste, 2008). À cette production viennent s'ajouter les circuits informels (non déclarés) de vente de légumes, non négligeables en Martinique.

Les jardins créoles familiaux (systèmes cultureaux complexes associant légumes, fruits, arbres) occupent quant à eux environ 1000 ha (Statistiques agricoles Agreste, 2007), soit donc 1/16ème des terres arables totales du département. En comparaison, les surfaces occupées pour la production commerciale de légumes (tubercules-racines-bulbes, légumes frais, légumes secs) est de 2256 ha (Statistiques agricoles Agreste, 2007). La production de ces jardins familiaux est difficilement estimable.

Dans le contexte de la diversification et de la relocalisation de la production agricole souhaitée au niveau régional et international (filières courtes, limitation des transports), il semble judicieux de préserver et développer le secteur maraîcher Martiniquais.

B) Incidence du flétrissement bactérien sur tomate à la Martinique

La culture de la tomate (variétés Caraïbo et Heatmaster principalement) est la principale culture légumière avec le concombre (Agreste). Elle a souffert d'une forte perte de rendement (- 60 %) en 2004 (figures 5 et 6), en raison d'une crise sanitaire imputable aux mauvaises conditions climatiques (sécheresse suivie d'un excès d'eau). Les maladies du bégomovirus,

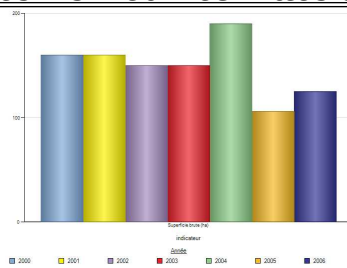


Figure 5: évolution de la surface brute de culture de tomate entre 2000 et 2006 (Agreste)

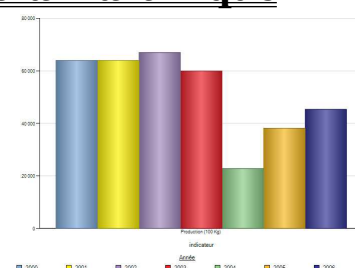


Figure 6: Évolution de la production de tomate entre 2000 et 2006 (Agreste)

transmis par des aleurodes (*Bemisia tabaci*), et le flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* ont ainsi subi un fort essor.

Depuis, la situation redevient peu à peu plus favorable, mais le prix à la production ne cesse d'augmenter (tableau 2).

Tableau 2: Évolution du prix à la production d'un kilo de tomate à la Martinique

	2004	2005	2006	2007
Prix au kg (€)	1,73	1,75	1,80	2,31

R. solanacearum reste très présent dans les sols martiniquais, et des souches émergentes très virulentes et à plus large spectre se développent. C'est ainsi par exemple qu'une souche s'attaquant aux cucurbitacées (giromon, melon et concombre) a été mise en évidence pour la 1^{ère} fois en 1999.

Il est ainsi nécessaire de développer une gestion phytosanitaire efficace du flétrissement bactérien en climat tropical, et de modifier en profondeur les systèmes de culture de la tomate, qui peuvent parfois comporter 3 à 4 cycles de tomate par an, offrant à *Ralstonia solanacearum* un terrain idéal de prolifération.

IV) UNE LUTTE PAR L'AGROÉCOLOGIE EN CLIMAT TROPICAL ?

A) Définition de l'agroécologie

Ce terme est né dans les années 1920 par le rapprochement des deux termes « agronomie » et « écologie ». L'agroécologie est une discipline agricole et scientifique visant à reconsidérer l'agrosystème dans sa complexité, et à l'étudier et le gérer en tant qu'écosystème. L'orientation de l'agriculture vers l'agroécologie s'inscrit dans la démarche d'*intensification écologique*, un des axes de recherche prioritaire du Cirad.

B) Le projet OMEGA³

Mon stage s'inscrit dans le projet OMEGA³ : **O**ptimisation des **M**écanismes **É**cologiques de **G**estion des bio-Agresseurs pour une **A**mélioration durable de la productivité des **A**grosystèmes.

« Le projet vise à préciser les mécanismes et conditions de réduction des impacts négatifs des bioagresseurs par introduction planifiée de diversité végétale spécifique dans les agrosystèmes. Il s'appuiera sur des agrosystèmes tropicaux contrastés en termes de diversité végétale spécifique (DVS) et de spectres de bioagresseurs, pour déterminer :

- comment étendre les principes de gestion des bioagresseurs par détournement stimulo-dissuasif avec des molécules mimétiques de processus liés à la DVS;
- comment composer avec les effets conflictuels de certains arrangements parcellaires ou paysagers dans le temps et l'espace pour optimiser la gestion des bio-agresseurs. [...] »

Mon stage s'inscrit dans la tâche n°1, sous-tâche n°1 :

Tâche N°1 du projet OMEGA3 : *Gestion des bio-agresseurs telluriques au niveau de la parcelle par rotations / associations avec des plantes de service à effets assainissants / biocides / allélopathiques.*

« Quels effets directs de la diversité végétale spécifique mobiliser et selon quelles modalités, pour optimiser la maîtrise des bio-agresseurs telluriques au niveau de la parcelle? »

Sous-tâche N°1 : *Introduction d'espèces végétales assainissantes pour la gestion du flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) chez la tomate à la Martinique.*

C) L'objet de mon stage : la recherche de plantes de services

1 - Évaluation du statut hôte / non hôte

Dans l'optique de l'introduction de plantes assainissantes dans les systèmes maraîchers, il est essentiel de vérifier que la plante en question ne peut se comporter comme hôte alternatif, risquant de maintenir la bactérie, voire de la multiplier.

Or, nous avons vu dans la première partie que certaines plantes sont porteuses saines de *R. solanacearum* sans en laisser apparaître de symptômes (infection latente).

Mes travaux font suite à ceux de Céline Jacmain, étudiante de l'Université Catholique de Louvain (Belgique), qui a effectué une première évaluation du statut hôte / non hôte de plantes de service candidates. Pour cette étude, j'ai ainsi utilisé le même protocole, mais avec plus de réplicats par plante à évaluer.

2 - Étude du potentiel allélopathique des plantes candidates

Le potentiel allélopathique des plantes de service candidates pour la lutte contre *R. solanacearum* peut être évalué par le potentiel antimicrobien de leurs extraits végétaux. Ces derniers sont en effet susceptibles d'être libérés par la plante pendant sa phase de décomposition en cas d'enfouissement des tissus végétaux après la phase culturale.

Nous avons pour ces travaux adapté un protocole à partir de la littérature, puis réalisé l'étude proprement dite.



- Chapitre 2 -

ÉVALUATION DU STATUT HÔTE / NON-HÔTE DE DIVERSES ESPÈCES VÉGÉTALES VIS-À-VIS DE *RALSTONIA SOLANACEARUM*

INTRODUCTION

Dans une optique de sélection de plantes de services efficaces pour la gestion de *Ralstonia solanacearum*, il est important de s'assurer que les plantes utilisées d'une part n'hébergent pas le pathogène à l'état latent, et d'autre part ne multiplient pas davantage la bactérie qu'un sol laissé nu. Par cette étude, nous cherchons donc à définir le statut hôte / non hôte de chaque plante de service candidate, et à évaluer les populations de *Ralstonia solanacearum* qui se développent dans leur rhizosphère.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	15
SOMMAIRE.....	15
I] MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	16
A) MATÉRIEL.....	16
1 - SOL.....	16
2 - MATÉRIEL VÉGÉTAL.....	16
3 - INOCULUM BACTÉRIEN.....	16
B) MÉTHODES.....	16
1 - CONDITIONS CONTRÔLÉES.....	16
2 - INOCULATION DE <i>R. SOLANACEARUM</i>	16
3 - DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL.....	17
4 - SUIVI DE L'EXPÉRIMENTATION.....	17
5 - EXTRACTION DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>	17
4 - COMPTAGES DES COLONIES DE <i>R. SOLANACEARUM</i>	18
5 - TRAITEMENT DES DONNÉES.....	18
II] RÉSULTATS.....	19
A) OBSERVATIONS SUR L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DES PLANTES.....	19
B) MULTIPLICATION DE <i>R. SOLANACEARUM</i> DANS LE SOL.....	19
D) STATUT HÔTE / NON HÔTE.....	20
C) RELATION ENTRE LES POPULATIONS DANS LE SOL ET DANS LA PLANTE.....	20
III] DISCUSSION.....	21

I) MATÉRIELS ET MÉTHODES

A) Matériel

1 - Sol

Des pots (9x9x9,5 cm) ont été remplis d'un mélange terre et terreau (1:1 en volume). Le terreau a préalablement été stérilisé à l'autoclave : 2 x 2 heures à 121°C, à 48h d'intervalle.

2 - Matériel végétal

Les plantes que nous avons testées sont données dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3: Liste des espèces végétales testées et propriétés biocides et agronomiques associées

Nom scientifique	N. commun	Potentiel biocide ou biofuge	Intérêt agronomique
<i>Trisetes natula</i>	Fillet d'Inde	Insectifuge	<i>non testé</i>
<i>Tagetes erecta</i>	Rose d'Inde	Nématicide	<i>non testé</i>
<i>Raphanus sativus</i> . Karakter	Raifort	biofumigation	Adapté au climat tropical, mais nécessite fertilisation
<i>Raphanus sativus</i> . 9713	Raifort	biofumigation	Adapté au climat tropical, mais nécessite fertilisation
<i>Allium fistulosum</i>	Oignon-œvi	effet biocide	Culture commerciale et vivrière
<i>Vigna unguiculata</i>	Niébé	Nématicide	Engrais vert (légumineuse), bon développement
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Siratro	Nématicide	Engrais vert (légumineuse), bon développement
<i>Solanum lycopersicum</i> cv Roma	Tomate Roma	Témoin positif de sensibilité	Culture commerciale et vivrière

Les plants de tomate ont été semés sur lit de semence, et repiqués au stade 2 feuilles vraies. Les bulbes d'oignons ont été achetés dans une coopérative, et replantés après démariage. Les autres espèces ont été semées directement en pots.

Les plantes ont été conservées en pépinière jusqu'à 3 semaines environ, puis déplacées en chambre climatique une semaine avant inoculation.

3 - Inoculum bactérien

La souche de *Ralstonia solanacearum* utilisée est la souche de référence 02.075 (Phyl2-seq4NPB). Elle appartient à la souche émergente de la Martinique, et a été isolée en 2002 au Morne Rouge, dans le nord de l'île, à partir d'un balisier (*Heliconia caribea*).

B) Méthodes

1 - Conditions contrôlées

Les plantes ont été placées en chambre climatique (photopériode de 14h ; 28-29°C le jour ; 26-27,5°C la nuit) une semaine avant inoculation, et ont reçu un arrosage quotidien afin d'obtenir des conditions optimales de croissance.

2 - Inoculation de *R. solanacearum*

- *Mise en suspension de R. solanacearum* : à partir d'une culture pure repiquée moins de 24 h avant sur CPG (Annexe 1 : milieux de culture)
- *Préparation de l'inoculum* : L'inoculum a été titré au spectrophotomètre à 10⁸ cfu/mL (Annexe 2). Nous avons procédé à un dénombrement sur boîte de Petri afin de confirmer ce procédé.
- *Méthode d'inoculation* : Un volume de 10 mL a été déposé à la surface de chaque pot, à la base de la tige des plants.

3 traitements témoins ont été réalisés :

- Traitement « Tomate + », tomate sensible (cv. Roma), recevant 10 mL d'inoculum à 10^8 cfu/mL.
- Traitement « Sol nu », sans plant, et recevant 10 mL d'inoculum à 10^8 cfu/mL.
- Traitement « Tomate - », tomate sensible (cv. Roma), recevant 10 mL d'eau distillée stérile.

3 - Dispositif expérimental

Nous avons un total de 10 traitements : 3 traitements « témoins » et 7 traitements « plante de service candidate ». Nous avons mis en place un dispositif en 3 blocs, avec pour chaque bloc 6 pots par traitement, soit un total de 18 pots par traitement. La position de chaque lot de 6 pots a été tirée au hasard au sein de chaque bloc. Un plan du dispositif est présenté en annexe 3.

4 - Suivi de l'expérimentation

Les 3 premiers plants de tomate « Tomate + » flétris ont été prélevés et nous avons vérifié la présence de la souche inoculée de *Ralstonia solanacearum*.

5 - Extraction de *Ralstonia solanacearum*

45 jours après inoculation, nous avons procédé traitement par traitement à l'extraction de *R. solanacearum* dans le sol rhizosphérique, les racines et les tiges des plantes de chacun des pots. Seuls les pots pour lesquels les plantes étaient complètement mortes ont été écartés.

a. Extraction de *R. solanacearum* dans le sol rhizosphérique

D'après la méthode de GRANADA et SEQUEIRA modifiée, 1983

- *Récupération du sol rhizosphérique* : les racines ont été délicatement sorties de terre, et secouées afin de récupérer le sol rhizosphérique. Le sol ainsi récupéré était homogénéisé par malaxage. 5 g de sol étaient prélevés et déposés dans un pilulier additionné de billes de verre, et recevaient 25 mL de tampon d'extraction (tampon Janse et Smalla).
- *Étalement de deux dilutions* : les piluliers étaient mis 30 mn sous agitation retournement, puis laissés au repos pendant 3 mn. Le surnageant était alors prélevé, et, selon les plantes, deux dilutions D1 (au $1/10^{\text{ème}}$) et D2 (au $1/100^{\text{ème}}$), ou D2 et D3 (au $1/1000^{\text{ème}}$) ont étéensemencées par étalement d'un volume donné sur milieu gélosé semi-sélectif SMSA en boîte de Petri (Annexe 1 : milieux de culture). Nous avons réalisé 2 boîtes par dilution.
- *Détermination de la teneur en eau du sol* : 2 pots contenant environ 10 g de sol frais ont été pesés, puis pesés à nouveau après séchage au four Pasteur (48h à 105°C) pour déterminer la teneur en eau.
- Les boîtes ensemencées ont été mises à incuber 3 jours à 28°C .

b. Extraction de *R. solanacearum* dans les racines et les tiges

- *Préparation des échantillons* : les racines étaient préalablement nettoyées à l'eau courante pour détacher le sol adhérent. Les tiges et les racines étaient immergées 20 s dans de l'alcool à 70° , puis séchées sur papier absorbant (Figure 7 ci-contre). Un échantillon de 1 g maximum était constitué pour chaque pot de chaque traitement.
- *Broyage et macération* : les échantillons étaient découpés au scalpel et broyés au pilon dans 2,5 mL (masse < 0,5 g) ou 5mL ($0,5\text{ g} < \text{masse} < 1\text{ g}$) de tampon Tris, et laissés macérer pendant 15 à 20 mn.
- *Étalement des dilutions D0 et D1* : Le surnageant était prélevé et dilué au $1/10^{\text{ème}}$. La D0 était étalée en 3 secteurs (Annexe 2), et un volume constant de la dilution D1 (au $10^{\text{ème}}$) était étalé sur milieu gélosé SMSA (2 réplicats réalisés).
- Les boîtes ensemencées ont été mises à incubation 3 jours à 28°C .



Figure 7: Plants de raphanus après arrachage, lavage à l'eau et trempage dans l'alcool à 70°

4 - Comptages des colonies de *R. solanacearum*

a. Dénombrement

Nous avons différencié et compté à l'œil nu les colonies de *Ralstonia solanacearum* sur chaque boîte (annexe 2). Les différents morphotypes adoptés par *Ralstonia solanacearum* en présence des autres bactéries présentes nous ont conduit pour certaines colonies à procéder à une vérification par repiquage en conditions favorables.

Les bactéries totales étaient également systématiquement dénombrées. Nous avons évalué notre capacité maximale de comptage à 200 cfu/boîte. Au delà, la valeur 200 était attribuée.

b. Confirmation de la souche inoculée

Pour chaque dilution de chaque type d'extraction (racine, tige, sol), une colonie présumée de *Ralstonia solanacearum* était mise en suspension puis soumise au phylotypage moléculaire pour confirmer l'identification de la souche inoculée (protocole de WICKER *et al*, 2007).

5 - Traitement des données

Nous avons utilisé le logiciel SAS® 9.1 pour l'analyse statistique de nos données.

a. Sol rhizosphérique

Pour l'extraction de *R. solanacearum* à partir du sol, nous avons effectué une ANOVA (analyse de la variance) à deux facteurs avec interaction (traitement, bloc, traitement x bloc) sur le nombre de cfu de *R. solanacearum* par gramme de sol sec. L'analyse des résidus (fournie en annexe 4) nous a fait opter pour une transformation LOG (1500 + cfu/g. sol sec).

b. Racine et tige

Nous avons là encore réalisé une ANOVA à 2 facteurs, et opté, suite à l'analyse des résidus, pour la transformation LOG (1500 + cfu/g.matière fraîche). Nous avons ensuite réparti les plantes de service candidates testées en 4 catégories selon la taille des populations de *Ralstonia solanacearum* dans les racines et dans les tiges :

- **Absence** : Population nulle ie LOG (1500 + 0 cfu/g. matière fraîche) = 3,17
- **(+)** : LOG (1500 + cfu/g. matière fraîche) < 3,7
- **(++)** : 3,7 < LOG (1500 + cfu/g. matière fraîche) < 4
- **(+++)** : LOG (1500 + cfu/g. matière fraîche) > 4

II] RÉSULTATS

A) Observations sur l'état physiologique des plantes

Seules les tomates positives ont montré des signes de flétrissement bactérien.

a. Tomates positives

Nous avons observé 2 comportements des tomates positives. Nous avons ainsi choisi de scinder le traitement « tomates positives » en deux traitements : « tomates + mortes » et « tomates + vivantes ».

- **Tomates + mortes** : Une partie des tomates étaient mortes de flétrissement bactérien au moment de la récolte, et séchées sur pied.

- **Tomates + vivantes** : Le reste des tomates ne montrait qu'un début de flétrissement ou pas de flétrissement du tout.

b. Le cas de *Vigna unguiculata*.

Le niébé (*Vigna unguiculata* cv. Ebony) a subi dans un bloc une attaque d'acariens, dans un autre une attaque de champignons et ne présentait pas de symptômes particuliers dans le troisième, à part quelques viroses (Figure 8). Ces attaques ont visiblement largement influé sur la population de *Ralstonia solanacearum* dans le sol (Figure 9). Nous avons donc préféré écarter le niébé de cette expérience.



Figure 8: Attaques subies le niébé dans les blocs 2 et 3 (au milieu et à droite)

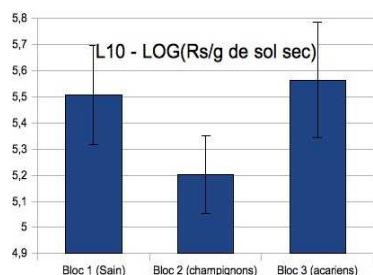
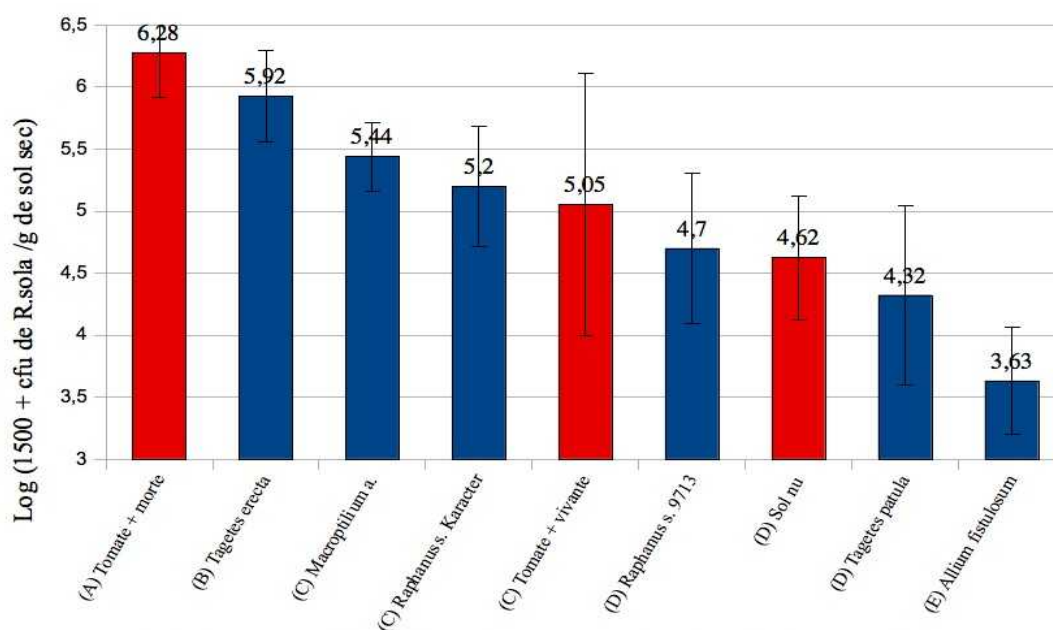


Figure 9: Population de *R. solanacearum* (transformation logarithmique) dans chaque bloc (1,2,3 de gauche à droite)

B) Multiplication de *R. solanacearum* dans le sol



Les traitements précédés d'une même lettre ne sont pas significativement différents

Figure 10: Populations de *R. solanacearum* dans le sol rhizosphérique : transformation log(1500+cfu/g. sol sec)

Tableau 4: Analyse de la variance : test des deux facteurs

L'analyse statistique réalisée est détaillée en Annexe 4. Le tableau 4 nous permet de voir que l'effet traitement est hautement significatif, tandis que l'effet bloc n'est pas significatif.

Source	DF	Type I SS	Carré moy	F	Pr > F
TRAIT	9	136.372	15.152	57.56	<.0001
BLOC	2	0.792	0.396	1.50	0.2239
TRAIT*BLOC	18	6.505	0.361	1.37	0.14

Nous avons réalisé un test de Student - Newman - Keuls (à 5 %) afin de déterminer les groupes statistiques. Les résultats obtenus sont donnés en figure 10.

• **Traitements témoins** : On remarque que la culture de tomate sensible, vivante ou morte, multiplie *Ralstonia solanacearum* par rapport à un sol laissé nu. Cependant, les plants de tomate ayant flétri et séché sur pied montrent une explosion de la population de *R. solanacearum* dans le sol par rapport aux tomates encore en bon état. Cela renforce l'idée qu'arracher les pieds atteints de flétrissement peut représenter un moyen efficace de contrôle de la maladie.

Les traitements négatifs sont bien exempts de *R. solanacearum*.

• **Plantes candidates** : On peut déjà noter une grande diversité entre les plantes testées. L'oignon peyi (*Allium fistulosum*) se dégage comme la plante candidate la plus intéressante : c'est la seule qui réduit significativement l'inoculum par rapport au sol nu. *Raphanus s. 9713* et *Tagetes patula* donnent des résultats proche de ceux du sol nu, il peuvent être des plantes de services également intéressantes. Au contraire, des plantes comme *Macroptilium atropurpureum* et *Tagetes erecta* multiplient significativement la bactérie.

D) Statut hôte / non hôte

Le tableau 5 présente les populations de *Ralstonia solanacearum* obtenues pour les racines et les tiges des différentes plantes de service candidates testées.

Tableau 5: Densité de *Ralstonia solanacearum* dans les racines et les tiges

organe	Densité de <i>Ralstonia solanacearum</i> dans les plantes			
	Absence	(+)	(++)	(+++)
RACINE	<i>Allium fistulosum</i>	<i>Raphanus s. 9713</i> <i>Raphanus s. Karakter</i> <i>Tagetes patula</i>		<i>Tagetes erecta</i> <i>Solanum lycopersicum</i> <i>Macroptilium a.</i>
TIGE	<i>Allium fistulosum</i>	<i>Raphanus s. 9713</i> <i>Raphanus s. Karakter</i> <i>Tagetes patula</i> <i>Macroptilium a.</i>	<i>Tagetes erecta</i> <i>Solanum lycopersicum</i>	

Allium fistulosum est la seule plante testée étant totalement dépourvue de *R. solanacearum* dans ses racines et dans ses tiges (non hôte). 3 autres plantes présentent une faible occurrence de la bactérie à la fois dans les racines et dans les tiges : *Raphanus s. cv; 9713*, *Raphanus sativus cv. Karakter* et *Tagetes patula* (hôtes à faible densité). *Tagetes erecta*, *Macroptilium atropurpureum* et le témoin tomate positive sont au contraire fortement colonisées (hôtes à forte densité).

C) Relation entre les populations dans le sol et dans la plante

Les plantes hébergeant *Ralstonia solanacearum* correspondant à celles multipliant la bactérie, nous avons voulu vérifier s'il existait une relation entre les densités de population de *R. solanacearum* dans le sol rhizosphérique et dans des différents organes

Pour cela, nous avons effectué un test des corrélations de Pearson, dont les résultats sont

présentés sur le tableau 6. Les régressions simples sont données en figures 11, 12 et 13.

Tableau 6: Test des corrélations de Pearson

	Sol rhizosphérique	Racine	Tige
Sol rhizosphérique	1	0,46518 (<0,0001)	0,21688 (0,0248)
Racine	0,46518 (<0,0001)	1	0,33436 (0,0004)
Tige	0,21688 (0,0248)	0,33436 (0,0004)	1

Les résultats montrent une haute corrélation entre les densités des populations du sol et des racine (Corr. = 0,47 ; $P < 0,0001$), et entre les populations des racines et les tiges (Corr. = 0,33 ; $P = 0,0004$). La corrélation entre sol et tige est également significative.

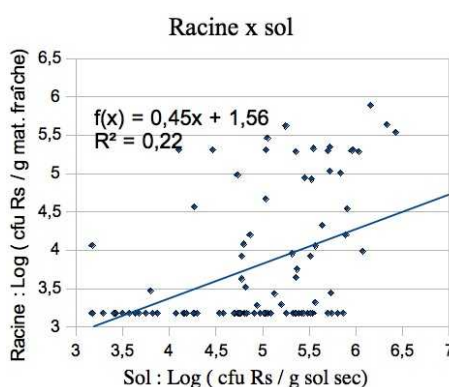


Figure 11: Régression racine x sol

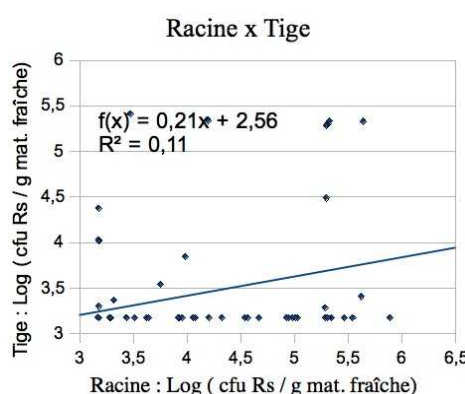


Figure 12: Régression racine x tige

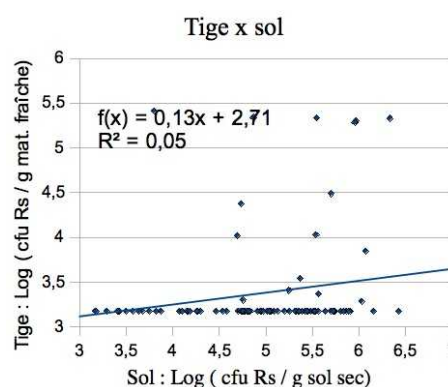


Figure 13: Régression tige x sol

III] DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus ont permis de distinguer différentes plantes selon leur statut hôte et leur capacité à multiplier *Ralstonia solanacearum* dans le sol rhizosphérique.

- ***Allium fistulosum* (Oignon peyi)** n'héberge pas le pathogène (non hôte), et réduit significativement la population de *Ralstonia solanacearum* dans le sol par rapport au traitement sol nu : Il a ainsi montré un fort potentiel assainissant.
- ***Tagetes patula* (Œillet d'Inde)** montre également un potentiel assainissant : il n'héberge *Ralstonia solanacearum* qu'à faible densité, et ne multiplie pas la bactérie dans le sol rhizosphérique. Ces résultats sont en accord avec ceux de TERBLANCHE et de VILLIER (1998), qui montrent que l'association avec l'œillet d'Inde permet de réduire les populations de *R. solanacearum* dans le sol et l'incidence de la maladie sur tomate.
- ***Raphanus sativus* cv 9713 et cv. Karakter (Raiforts)** sont tous deux des hôtes à faible densité. Cependant, le premier ne multiplie pas *R. solanacearum* dans le sol, tandis que le second multiplie significativement le pathogène. *Raphanus s.* cv 9713 montre donc un potentiel assainissant, tandis que le cultivar Karakter semble moins intéressant. Étant tous deux de la famille des brassicacées (biofumigante), leur potentiel assainissant pourrait s'exprimer davantage lors de leur décomposition.

D'autre part nous avons mis en évidence une forte corrélation entre les populations de *R. solanacearum* présentes dans le sol et les racine, ce qui révèle le transfert de la bactérie entre ces deux compartiments.

L'expérience peut ainsi être complétée avec les autres plantes de service candidates : le niébé, que nous avons dû écarter, ainsi que des variétés de *Mucuna* et de *Crotalaria* (légumineuses).

Une étude plus complète de la suppressivité du sol pourrait ensuite être réalisée, en transplantant des plants de tomate dans des sols soumis à ces différentes plantes de services candidates, ou en testant directement l'impact de celles-ci en association (oignon pays par exemple).



- Chapitre 3 -

ÉVALUATION *IN VITRO* DE L'EFFET ANTIBACTÉRIEN D'EXTRAITS VÉGÉTAUX SUR LA CROISSANCE DE *RALSTONIA* *SOLANACEARUM*

INTRODUCTION

Souhaitant préciser les mécanismes d'action des plantes de services candidates dégagées dans le chapitre précédent (évaluées sur leur statut hôte / non hôte), nous avons décidé d'étudier l'activité antimicrobienne de leurs extraits aqueux sur la croissance *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. Nous avons de plus voulu étoffer la liste des plantes candidates dans la lutte contre ce pathogène par l'évaluation d'autres plantes aux effets biocides déjà connus dans la littérature.

Dans ce chapitre, nous présentons dans une première partie les propriétés biocides d'extraits végétaux dont la littérature fait état. Nous avons dans un premier temps mis au point notre protocole expérimental en nous inspirant des travaux publiés, puis avons réalisé l'étude *in vitro* de l'effet antibactérien d'extraits aqueux végétaux sur la croissance de *Ralstonia solanacearum*.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	23
SOMMAIRE.....	23
I] LES EFFETS BIOCIDES DES EXTRAITS VÉGÉTAUX.....	24
II] MISE AU POINT DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.....	25
A) ÉVALUATION IN VITRO DE L'EFFET ANTIBACTÉRIEN.....	25
1 - CRITÈRES D'ÉVALUATION.....	25
2 - TECHNIQUE DE DIFFUSION EN MILIEU SOLIDE.....	25
3 - TECHNIQUE DE MACRODILUTION EN MILIEU LIQUIDE.....	26
B) ADAPTATIONS AUX CONTRAINTES SPÉCIFIQUES À CETTE ÉTUDE.....	27
1 - INADÉQUATION DE LA DIFFUSION EN MILIEU SOLIDE.....	27
2 - UTILISATION D'UN SPECTROPHOTOMÈTRE.....	27
3 - ÉLARGISSEMENT DE LA GAMME DE CONCENTRATION	28
C) VALIDATION DU PROTOCOLE.....	29
1 - UN PROTOCOLE PEU COÛTEUX EN TEMPS ET DES RÉSULTATS RÉPÉTABLES.....	29
2 - FIABILITÉ ET GESTION DU RISQUE DE CONTAMINATION.....	29
III] ÉTUDE DE L'EFFET ANTIBACTÉRIEN DES EXTRAITS VÉGÉTAUX.....	30
A) MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	30
1) MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....	30
2) MÉTHODES.....	30
B) RÉSULTATS.....	32
1 - PLANTES DÉJÀ ÉVALUÉES POUR LE STATUT HÔTE / NON HÔTE VIS-À-VIS DE <i>R. SOLANACEARUM</i>	32
2 - CRIBLAGE SUR LES AUTRES EXTRAITS.....	33
DISCUSSION.....	34
A) ÉVALUATION DES EXTRAITS.....	34
B) QUELLES UTILISATIONS AGRONOMIQUES ENVISAGEABLES ?.....	34
1 - GÉNÉRALITÉS SUR L'EXPLOITATION DES EFFETS ALLÉLOPATHIQUES.....	34
2 - STRATÉGIES ENVISAGEABLES POUR LES 5 PLANTES DÉGAGÉES.....	35
C) LIMITES DE L'ÉTUDE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	35

I] LES EFFETS BIOCIDES DES EXTRAITS VÉGÉTAUX

L'effet biocide des extraits végétaux est exploité depuis des millénaires par l'homme, notamment dans le domaine de la médecine. Ces extraits végétaux sont l'objet d'évaluation non seulement dans une optique médicale (COWAN, 1999; KABLAN, 2008 ; LIRIO, 1998 ; SOUZA, 1995), mais également pour agricole.

En effet, dans le climat général de limitation de l'agrochimie, les extraits végétaux présentent un potentiel pour l'obtention de nouvelles formes de pesticides, moins chers à la production, et peut-être moins nocifs pour l'homme et l'environnement : les biopesticides. Des effets biocides des extraits végétaux ont été montrés contre :

- **Les champignons** : Par exemple, l'extrait végétal d'ail est capable de réduire la germination des spores de champignons pathogènes du riz, de l'arabette des dames, et de la pomme de terre (CURTIS *et al*, 2004).
- **Des parasites telluriques comme les nématodes** : La mobilité des nématodes peut être réduite par l'application d'extraits végétaux de plantes telles que *Tagetes erecta* (NATARAJAN *et al*, 2006), *Crotalaria virgulata* (JOURAND *et al*, 2004), *Pseudowintera colorata* et *Plagiochila stephensoniana*, une hépatique (LORIMER *et al*, 1996).
- **Des bactéries pathogènes des plantes** : Des travaux de criblage de l'activité antimicrobienne ont montré les effets de certains extraits végétaux (ail, figuier, familles des *liliacées* et des *moraceae*) contre différentes bactérioses de la tomate (QUATTRUCCI et BALESTRA, 2009 ; BALESTRA *et al*, 2009).
- **Et aussi plus particulièrement contre *R. solanacearum*** : Des travaux récents ont été réalisés plus spécifiquement sur *Ralstonia solanacearum*. Il a ainsi été montré que les extraits végétaux d'ail, de datura et de laurier rose permettent *in vitro* et *in vivo* de réduire la population de *R. solanacearum* de la pomme de terre. Les extraits réalisés à froid sont les plus efficaces (ABO-ELYOUSR *et al*, 2009). De même, les extraits de feuille d'aloé vera et de feuilles et fruits d'ashwagandha (EL-ARIQI *et al*, 2005), et de poireau, ail et d'une euphorbe (LIRIO *et al*, 1998) ont montré leur potentiel antibactérien contre le flétrissement. Une autre étude a permis de révéler 4 autres extraits aqueux efficaces contre *R. solanacearum* (de MORAIS, 2002)

La plupart des études sur l'activité antibactérienne d'extraits végétaux vis-à-vis de *R. solanacearum* mettent en avant la possibilité de les utiliser en tant que biopesticides. Cependant, l'évaluation des effets antibactériens des extraits pourrait également traduire l'effet allélopathique de ces derniers, s'exprimant pendant leur phase de décomposition. Cet effet allélopathique peut alors être exploité dans un système de rotation avec enfouissement de la plante de services.

II] MISE AU POINT DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

A) Évaluation in vitro de l'effet antibactérien

1 - Critères d'évaluation

a. Bactériostase et bactéricidie

On distingue deux types d'effets antibactériens : L'activité antibactérienne peut en effet se traduire par une croissance ralentie de la bactérie considérée (pour de faibles concentrations en substance), ou par une réduction du nombre initial de bactéries (pour de fortes concentrations). On parle dans le premier cas de concentrations bactériostatiques, et dans le second cas de concentrations bactéricides.

Les paramètres couramment utilisés pour caractériser l'effet antibactérien d'une substance sont la CMI et la CMB.

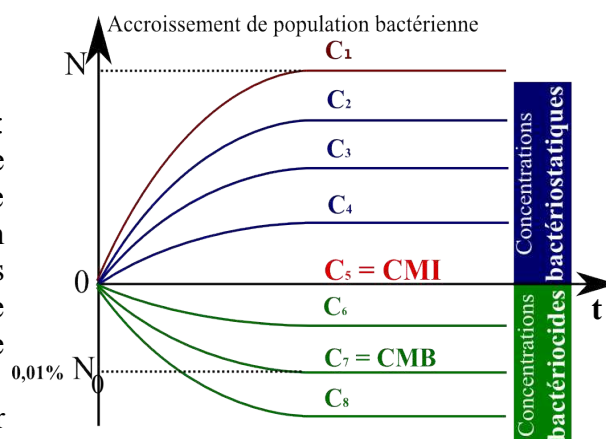


Figure 14: Concentrations bactériostatiques et bactéricides (N0 : population initiale)

b. La CMI, concentration minimale inhibitrice

La CMI, Concentration Minimale Inhibitrice, est la concentration pour laquelle la croissance bactérienne est nulle. Elle correspond donc à la frontière entre bactériostase (la population bactérienne croît moins vite) et bactéricidie (la population bactérienne diminue). À chaque couple bactérie-substance correspond, pour un protocole standardisé, une unique CMI.

c. La CMB, concentration minimale bactéricide

La CMB, Concentration Minimale Bactéricide, est la concentration pour laquelle on observe 0,01% de survie au bout d'un temps donné, c'est à dire que 99,99% de l'inoculum de départ a été tué.

2 - Technique de diffusion en milieu solide

a. Principe et réalisation

La méthode consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné avec la substance à tester sur un milieu gélosé ensemencé en bactéries, et à mesurer après un temps donné le diamètre d'inhibition, c'est à dire la taille de la zone pour laquelle on n'observe pas de croissance bactérienne.

Elle repose sur le principe de la création d'un gradient de concentration autour de ce disque, du fait de la diffusion de la substance dans la gélose (figure 15). La frontière entre le tapis bactérien et la zone d'inhibition correspond à une concentration égale à la CMI.

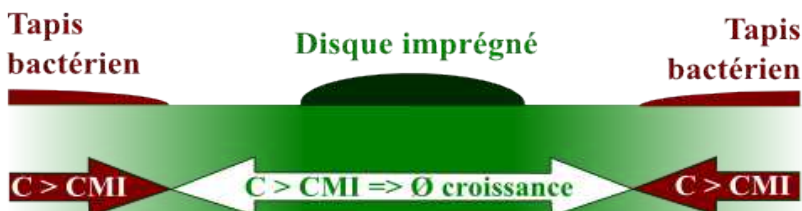


Figure 15: Principe de la méthode : vue en coupe transversale

b. Résultats obtenus par la méthode

Cette méthode ne permet pas de déterminer la valeur de la CMI, mais de comparer des substances entre elles dans le cadre d'un même protocole. La technique a par exemple été utilisée pour les travaux d'ABO-ELYOUSR et ASRAN, pour comparer l'activité d'extraits aqueux de différentes plantes vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum*.

En effet, le gradient de concentration établi dépend des conditions expérimentales : il va notamment varier en fonction de la charge du disque et de l'épaisseur et de la nature de la gélose, Cette méthode permet toutefois de comparer des résultats respectant strictement les mêmes conditions expérimentales. Les laboratoires utilisent très couramment cette méthode pour évaluer la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique en se référant à des abaques établis par l'Organisation Mondiale pour la Santé, dans le cadre d'un protocole standardisé.

3 - Technique de macrodilution en milieu liquide

a. Principe et réalisation

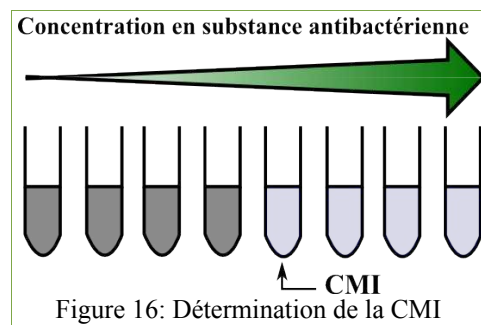
Dans cette méthode, on cherche s'il y a ou non croissance bactérienne pour une concentration donnée en substance à tester. Pour cela, on réalise une gamme de concentration de la substance considérée, on ajoute la bactérie à étudier et un bouillon de culture, puis on détermine, après un temps donné d'incubation, s'il y a eu croissance de la bactérie.

b. Détermination de la CMI

La méthode de la macrodilution en milieu liquide apporte un encadrement de la valeur de la CMI. En effet, le premier tube pour lequel aucune croissance n'est mesurable a, par définition, une concentration en substance supérieure ou égale à la CMI. De même le dernier tube pour lequel on mesure une croissance bactérienne a nécessairement une concentration inférieure à la CMI. De façon courante, on admet que la CMI est la concentration du premier tube sans croissance mesurable.

Pour mesurer cette croissance bactérienne, plusieurs moyens sont possibles :

- *Mesure visuelle* : La croissance bactérienne se traduit par un trouble observable à l'œil nu. L'inconvénient de cette méthode est que la disparition du trouble se fait assez progressivement, ce qui rend difficile de décider strictement de la valeur de la CMI.
- *Mesure de turbidité au densitomètre* : C'est la technique utilisée par l'équipe de MOROH dans leurs travaux (MOROH *et al*, 2008). La turbidité, exprimée en McFarland, est proportionnelle à la concentration bactérienne. La CMI correspond à la concentration en extrait pour laquelle les turbidités initiales et finales sont égales.



d. Construction de courbes de survie.

L'utilisation du densitomètre permet la construction de courbes de survies. On établit alors le taux de survie suivant (MOROH & al, 2008) :

$$T_{\text{survie}}(x) = \frac{D_f^x - D_i^x}{D_f^{\text{témoin}} - D_i^{\text{témoin}}}$$

D_i^x : Turbidité initiale du tube à la concentration x

D_f^x : Turbidité finale (à 24h par exemple) du tube à la concentration x

$D_i^{\text{témoin}}$: Turbidité initiale du tube témoin (sans extrait)

$D_f^{\text{témoin}}$: Turbidité finale du tube témoin (sans extrait)

L'évolution de ce taux de survie en fonction de la concentration est alors appelée courbe de survie $C: [y = T_{\text{survie}}(x)]$

c. Détermination d'une concentration minimale bactéricide : la $C_{0,01\%}$

La CMB classique se mesure dans des conditions standardisées, en fonction de la population de l'inoculum de départ, qui se trouve en phase exponentielle de croissance.

Dans ce travail, nous déterminerons plutôt la $C_{0,01\%}$, concentration pour laquelle on dénombre moins de 0,01 % de survie par rapport au **témoin positif de croissance bactérienne à 24h** (cf définition du taux de survie dans le 3-d.), qui se trouve lui en phase stationnaire de croissance.

Pour la déterminer, il faut donc mesurer cette population de façon précise (l'utilisation d'un densitomètre ne permet pas une telle exactitude). On dilue donc le tube témoin positif à 10^{-4} pour représenter une survie de 0,01 %, et on compare la population des différents tubes à cette référence.

Dans leur étude, MOROH & al procèdent sur milieu gélosé à des ensemencements en stries de 5 cm. Le premier tube expérimental dont le nombre de cfu est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspond à la CMB. En raison du caractère muqueux des colonies de *Ralstonia solanacearum*, nous n'avons pas pu compter les germes sur de telles stries. Nous avons donc opté pour un dénombrement par étalement d'un volume donné sur milieu gélosé en boîte de Petri.

B) Adaptations aux contraintes spécifiques à cette étude

1 - Inadéquation de la diffusion en milieu solide

Nous avons d'abord concentré nos efforts sur la mise au point du protocole pour la méthode de la diffusion en milieu solide. Nous avons obtenu de bons résultats pour les tests préliminaires avec des antibiotiques, mais aucun effet n'était mesurable pour les premiers extraits végétaux, dans la gamme de concentration testée. Nous avons fait le choix de laisser de côté cette méthode pour se concentrer sur la technique de macrodilution en milieu liquide.

2 - Utilisation d'un spectrophotomètre

Ne disposant pas de densitomètre, nous avons effectué nos mesures au spectrophotomètre. Il permet en effet également d'évaluer la population de *Ralstonia solanacearum*, mais présente dans notre cas un désavantage : contrairement à la valeur de turbidité (qui ne dépend que la teneur en matières non dissoutes), l'absorbance dépend de la coloration du milieu. Or, nos extraits aqueux végétaux sont colorés. Nous avons donc dû :

- Créer une « gamme couleur », sorte de double de notre gamme expérimentale, non ensemencée en bactéries
- Mesurer les absorbance de cette gamme à l'instant initial et à l'instant final pour prendre en compte

l'évolution de la couleur (phénomènes d'oxydation) au cours du temps.

- Adapter le taux de survie proposé par MOROH *et al*, comme présenté dans l'encadré 1 ci-dessous

$$T_{\text{survie}}(x) = \frac{\text{Croissance bactérienne (tube } x)}{\text{Croissance bactérienne (tube témoin)}} = \frac{A_{\text{bact}}^f(x) - A_{\text{bact}}^i(x)}{A_{\text{bact}}^f(\text{témoin}) - A_{\text{bact}}^i(\text{témoin})}$$

Si l'on suppose $A_{\text{tot}} = A_{\text{extrait}} + A_{\text{bact}} + A_{\text{interaction}}$

On mesure A_{tot} et A_{extrait} par lecture des tubes des deux gammes.

On ignore A_{bact} et $A_{\text{interaction}}$. On néglige $A_{\text{interaction}}$.

Alors : $A_{\text{bact}} = A_{\text{tot}} - A_{\text{extrait}}$

Donc $A_{\text{bact}}^f - A_{\text{bact}}^i = (A_{\text{tot}}^f - A_{\text{extrait}}^f) - (A_{\text{tot}}^i - A_{\text{extrait}}^i)$

D'où le nouveau taux de survie :

$$T_{\text{survie}}(x) = \frac{(A_{\text{tot}}^f(x) - A_{\text{extrait}}^f(x)) - (A_{\text{tot}}^i(x) - A_{\text{extrait}}^i(x))}{A_{\text{bact}}^f(\text{témoin}) - A_{\text{bact}}^i(\text{témoin})}$$

Encadré 1: Adaptation du taux de survie

3 - Élargissement de la gamme de concentration

Nous avons ainsi testé un premier extrait, l'extrait 44 (feuilles de Neem), avec une gamme de concentration au demi allant de 30 mg/mL à $30 \cdot 2^{-9}$ mg/mL (10 tubes). Nous avons alors obtenu la Figure 17 :

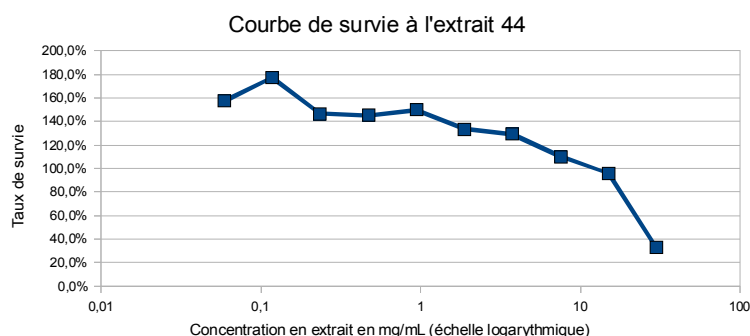


Figure 17: Courbe de survie : gamme de 10 tubes

On observe que pour des concentrations inférieures à 7,5 mg/mL, le taux de survie est significativement au dessus de 100%. Pour préciser la dynamique de réaction à de faibles doses d'extrait, nous avons élargi notre gamme de travail à 15 tubes, soit une concentration minimum de $30 \cdot 2^{-14}$ mg/mL. Les concentrations les plus faibles donnaient alors bien des résultats semblables à celui du témoin positif (figure 18).

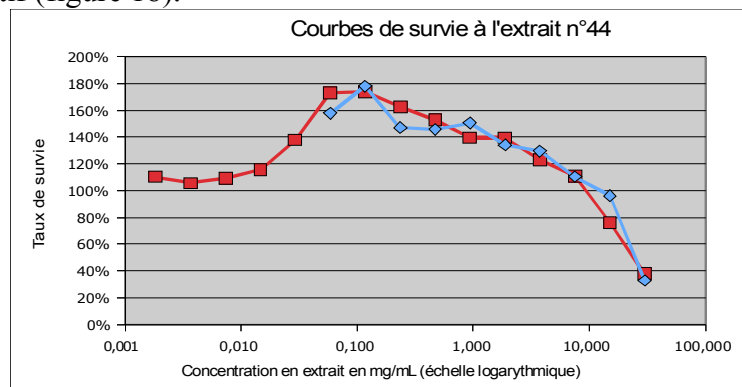


Figure 18: Courbe de survie : gamme de 15 tubes

C) Validation du Protocole

1 - Un protocole peu coûteux en temps et des résultats répétables

- **Sensibilité** : La gamme de concentration d'extrait permet de bien recouvrir les différents comportements possibles des extraits, depuis l'absence d'effet jusqu'à une forte inhibition de la croissance bactérienne.
- **Mise en œuvre** : Le protocole obtenu demande, outre la préparation préalable du matériel, 1h le premier jour puis 1h le lendemain, par réplicat d'extrait. Cela nous a permis d'étaler nos réplicats sur plusieurs jours, et d'obtenir rapidement les résultats.
- **Répétabilité** : Le protocole établi nous permet d'obtenir une bonne répétabilité.

2 - Fiabilité et gestion du risque de contamination

La principale faiblesse de notre protocole réside dans la forte occurrence de contaminations. La présence d'un contaminant modifie bien entendu la courbe de survie obtenue (on mesure la population de *Ralstonia solanacearum* et celle du contaminant). Le protocole contient cependant des moyens de détection systématique des contaminations :

- Les tubes témoins + et au moins les deux tubes les plus concentrés en extrait sont étalés pour déterminer la CMB.
- Le logarithme des valeurs d'absorbance de la gamme témoin couleur doivent par construction tracer une droite de coefficient directeur 2 : les valeurs aberrantes sont alors facilement repérable. Le tube concerné est alors étalé en 3 secteurs pour test de contamination
- Lors de la construction de la courbe de survie, les valeurs aberrantes, ou jugées trop éloignées de la courbe, sont également étalées pour test de contamination.

Suite à ces test, s'il s'avère que les tubes témoins + et gamme test sont contaminées, on invalide l'expérience. La contamination ponctuelle de quelques tubes de la gamme témoin couleur ne suffit pas à invalider l'expérience.

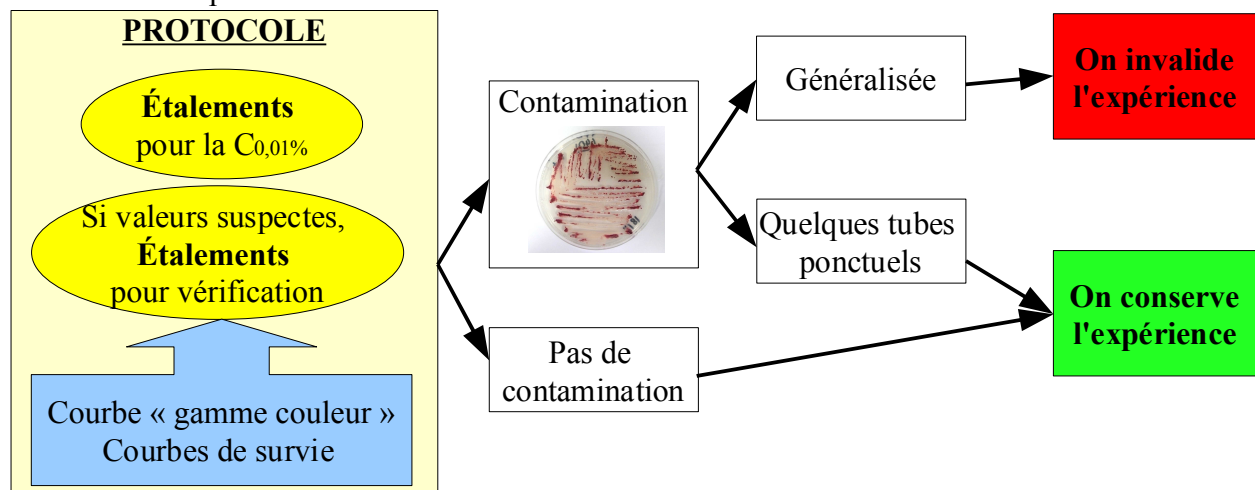


Figure 19: Organigramme de décision : test des contaminations et validation de l'expérience

III] ÉTUDE DE L'EFFET ANTIBACTÉRIEN DES EXTRAITS VÉGÉTAUX

A) Matériels et méthodes

1) Matériel biologique

a. Extraits végétaux

Nous avons évalué 15 extraits végétaux, dont la liste et les atouts sont donnés en annexe 6. Nous avons utilisé des extraits végétaux aqueux lyophilisés (figure 20), préparés par Jean Michel RIZÈDE (Cirad de Guadeloupe). Pour limiter leur dégradation, ces extraits sont conservés à l'abri de la lumière et de l'humidité, et sont remis en suspension (dans de l'eau distillée stérile) juste avant utilisation.



Figure 20:
Extrait
lyophilisé

b. Souche bactérienne

La souche de *Ralstonia solanacearum* que nous avons utilisée est la souche 02.075, de phylotype II seq4NPB, appartenant à la population émergente de la Martinique. Elle a été isolée à partir d'un balisier (*Heliconia caribea*) à Morne Rouge, dans le nord de l'île.

2) Méthodes

L'ensemble des manipulations (sauf la lecture au spectrophotomètre) a été réalisé en conditions stériles. Le travail s'effectuait sous hotte bactériologique, et le matériel, l'eau et les milieux étaient systématiquement stérilisés à l'autoclave (20 mn à 120°C). L'annexe 7 présente le protocole utilisé de façon détaillée.

a. Choix du nombre de réplicats selon les extraits.

Ne disposant pas durant ce stage d'un temps suffisant pour effectuer 3 réplicats par extrait (ce qui était souhaité à l'origine), nous avons effectué le choix suivant :

- Les extraits des plantes dont le statut hôte / non-hôte a été évalué en chambre climatique ont été testés 2 fois.
- Un criblage a été réalisé sur les autres extraits : ils n'ont été testés qu'une unique fois. Seuls ceux présentant un effet antibactérien manifeste ont ensuite bénéficié de réplicats supplémentaires.

b. Préparation de l'inoculum de *R. solanacearum*.

Nous avons utilisé pour chaque expérience une culture jeune de moins de 24h sur milieu CPG. La souche était mise en suspension dans de l'eau distillée stérile pour la titrer à 10⁹cfu/mL au spectrophotomètre. L'inoculum était préparé au dernier moment à 10⁸cfu/mL par dilution au 1/10^{ème} dans du bouillon CPG.

c. Réalisation des gammes expérimentales et témoins.

- **Dilution de l'extrait** : Nous avons réalisé des dilutions successives au demi de chaque suspension d'extrait dans de l'eau distillée stérile afin d'obtenir deux gammes de 120 à $120 \cdot 2^{-14}$ mg/mL (120 mg/mL à $7,3242 \mu\text{g/mL}$)
- **Inoculation** : La gamme test était alors inoculée par l'ajout de bouillon CPG inoculé avec la souche 02.075 à 10^8 cfu/mL. La gamme couleur, quant à elle, recevait du bouillon CPG non inoculé. La concentration en extrait de nos deux gammes était ainsi ramenée à 30 mg/mL dans le tube le plus concentré.
- **Témoins** : Pour chaque réplicat d'extrait, nous avons préparé :
 - 3 témoins positifs (eau distillée stérile + bouillon inoculé avec *R. solanacearum*) fixant le 100 % de croissance bactérienne.
 - 1 témoin négatif (eau distillée stérile + bouillon non inoculé)

d. Lectures initiales et finales.

La 1ère lecture s'effectuait juste après préparation des gammes (à t0), puis les gammes expérimentales étaient mises à incuber 24h à 28°C en étuve bactériologique. La lecture finale était alors réalisée (à t24h).

Pour pouvoir effectuer la lecture sans quitter les conditions stériles, nous avons prélevé, sous la hotte, pour chaque tube le volume nécessaire à chaque lecture. Nous les avons dilués au $1/10^{\text{ème}}$ dans de l'eau distillée stérile, pour obtenir un volume suffisant à la lecture en cuve semi-micro (volume maximal 1,3 mL).

e. Courbes de survie et CMI

Pour chaque réplicat d'extrait, nous avons construit une courbe de survie grâce au taux de survie détaillé dans la partie précédente. La CMI correspond au 0% de survie (croissance bactérienne nulle). Le taux de survie est par construction très variable aux alentours de 0%, c'est pourquoi nous avons choisi le taux de survie de 5% comme seuil pour déterminer la CMI.

f. Détermination de la $C_{0,01\%}$.

- **Dilutions et étalement** : Seuls les tubes ayant une concentration supérieure ou égale au tube précédant la CMI ont été utilisés pour déterminer la $C_{0,01\%}$. Le témoin positif à t = 24h était dilué à 10^{-4} pour simuler 0,01% de survie.
- **Lecture** : La population bactérienne de chaque tube considéré était alors dénombrée par étalement d'un volume constant sur boîte de Petri, puis comparée à celle correspondant à 0,01% de survie afin d'obtenir un encadrement de la $C_{0,01\%}$ (figure 21)

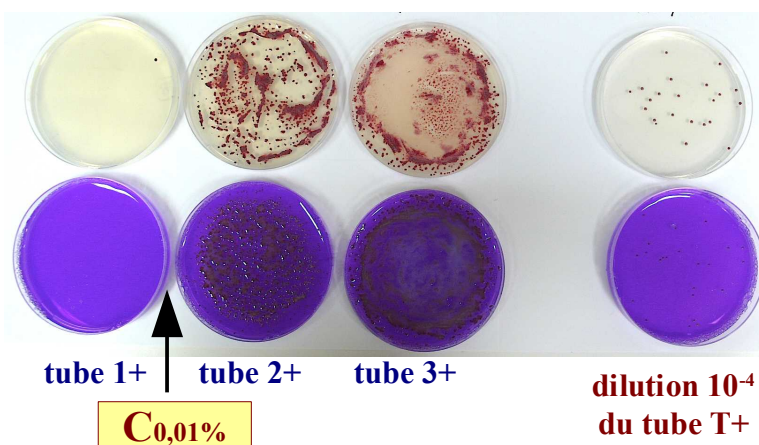


Figure 21: Détermination d'un encadrement de la $C_{0,01\%}$ par dénombrement sur boîte de Petri

B) Résultats

1 - Plantes déjà évaluées pour le statut hôte / non hôte vis-à-vis de *R. solanacearum*

Nous disposons d'extraits lyophilisés pour uniquement 3 des 7 espèces testées en chambre climatique sur le statut hôte / non hôte vis à vis de *Ralstonia solanacearum* : *Raphanus sativus* cv. 9713 et *Raphanus sativus* cv. Karakter (Raiforts), et *Macroptilium atropurpureum* (Siratro). Nous avons effectué 2 réplicats pour chacun.

a. *Macroptilium atropurpureum*

La courbe de survie obtenue (figure 22) nous permet de dégager 3 plages de concentration pour lesquelles on observe des réactions différentes de *Ralstonia solanacearum* à la présence de l'extrait.

- Faibles concentrations d'extrait : pas d'incidence de l'extrait
- Concentrations moyennes : stimulation de la croissance bactérienne (source alternative d'énergie ou d'oligoéléments?)
- Fortes concentrations : bactériostase, et bactéricidie.

La $C_{0,01\%}$ est quant à elle comprise entre 30 mg/mL (tube 1) et 15 mg/mL (tube 2).

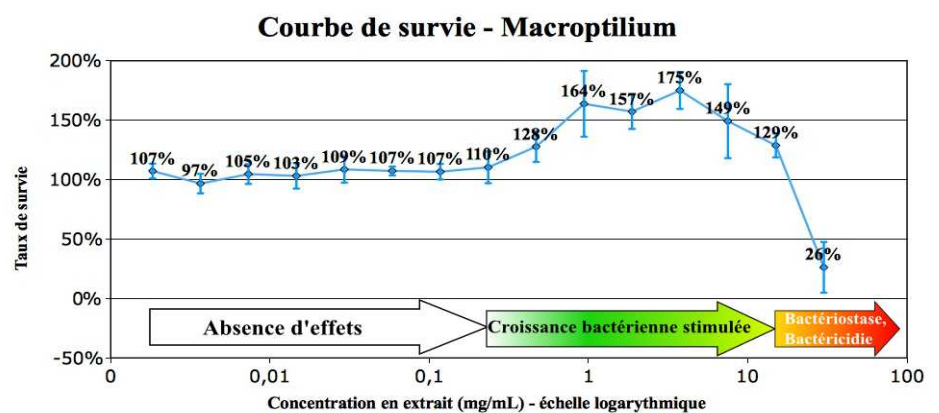


Figure 22: Courbe de survie de *Macroptilium atropurpureum* - plages de concentrations

b. *Raphanus sativus* cv. Karakter et cv. 9713.

Les courbes obtenues pour les deux variétés de *Raphanus* (figure 23) sont très proches, et montrent au contraire une activité bactériostatique (moins de 30% de survie) importante de leurs extraits végétaux, pour des concentrations supérieures à 7,5mg/mL (tube 3). Aucune phase de stimulation bactérienne n'est visible.

Nous avons de plus obtenu pour chaque réplicat de chaque *Raphanus* une $C_{0,01\%}$ comprise entre 15 mg/mL (tube 2) et 7,5 mg/mL (tube 3).

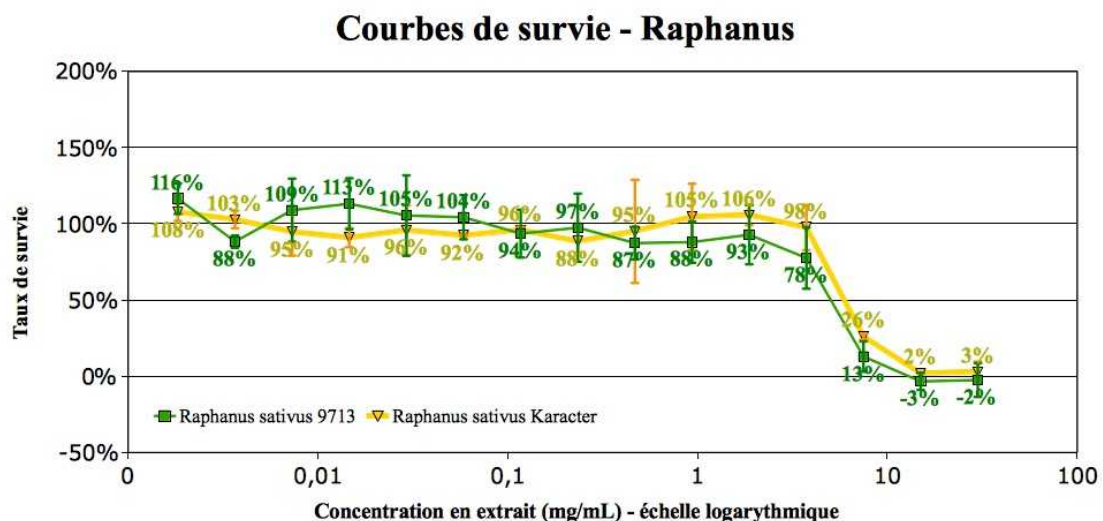


Figure 23: Courbes de survie : *Raphanus* s. cv. 9713 (vert) et cv. Karakter (jaune)

2 - Criblage sur les autres extraits

a. Constitution de deux catégories d'extraits

Nous avons effectué pour le reste des extraits lyophilisés un unique réplicat afin d'obtenir dans les temps impartis un premier criblage de leur effet antibactérien vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum*.

La figure 24 retrace le comportement de *Ralstonia solanacearum* selon la concentration des extraits testés. Les couleurs froides (bleus) traduisent une stimulation de la croissance de la bactérie, tandis que des couleurs chaudes (jaunes, oranges) traduisent une inhibition de cette croissance. En raison de la forte variabilité du taux de survie à l'approche de 0%, le critère « survie inférieure à 0,01% », traduit par la couleur rouge, a été évalué par dénombrement sur boîte de Petri.

Ce criblage nous permet de dégager deux catégories d'extraits végétaux en fonction de leur comportement :

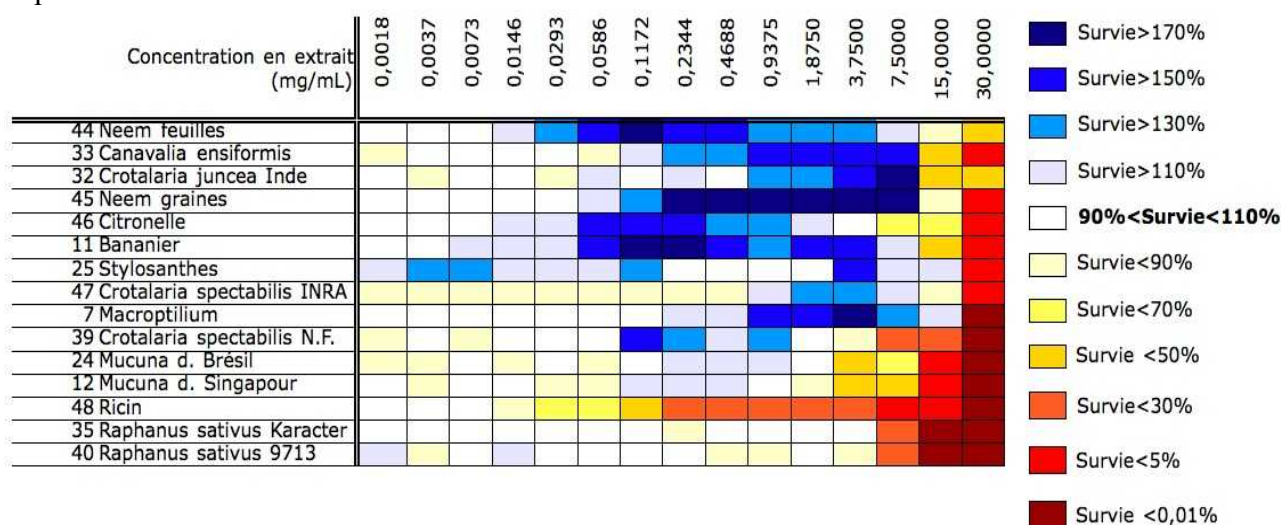


Figure 24: Criblage des extraits végétaux

- Les extraits présentant une forte stimulation bactérienne (taux de survie > 130 %) pour une plage de concentrations données
- Les extraits ne présentant pas de stimulation bactérienne

b. Extraits végétaux ne présentant pas de phase stimulatrice

Seulement 5 des 15 extraits testés ne montrent pas de phase de forte stimulation de la croissance de *Ralstonia solanacearum* (survie ≤ 140%). Parmi ces 5 extraits, les *Raphanus sativus* sont les plus agressifs pour de fortes concentrations. Cependant, *Ricinus communis* et les *Mucuna deeringiana* présentent une activité bactériostatique dès de plus faibles concentrations.

Courbes de survie - *Mucuna deeringiana*

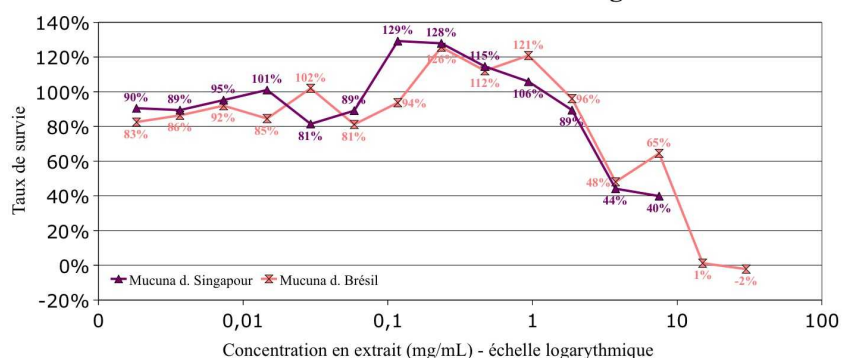


Figure 25: Courbes de survie de *Mucuna deeringiana* or. Singapour (violet) et Brésil (rose)

Les deux *Mucuna deeringiana* ont un comportement assez proche, avec une phase de stimulation assez réduite, suivie par une inhibition régulière de la croissance de *Ralstonia* (figure 25).

Nous avons réalisé 3 réplicats supplémentaires pour le Ricin, et obtenu la courbe de survie ci-dessous (figures 26 et 27) :

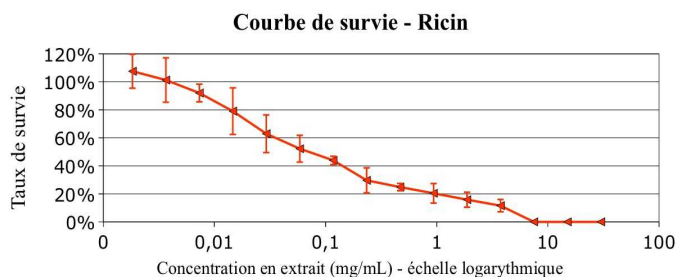


Figure 27: Courbe de survie de Ricinus communis - échelle logarithmique

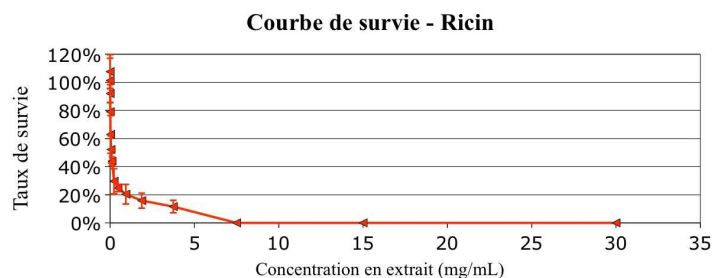


Figure 26: Courbe de survie de Ricinus communis

L'extrait végétal de Ricin (figures 26 et 27) montre une activité antibactérienne forte et régulière (inhibition logarithmique de la croissance bactérienne), qui s'exprime dès les plus faibles concentrations testées. On descend notamment sous 50% de survie dès le 10ème tube (concentration d'environ 0,0059mg/mL).

DISCUSSION

A) Évaluation des extraits

Nous avons dégagé par cette étude une typologie possible des extraits selon l'existence ou non d'une plage de concentration pour laquelle ils stimulent la croissance bactérienne de *Ralstonia solanacearum*. Les extraits possédant ce potentiel stimulant sont également ceux pour lesquels l'inhibition de la croissance bactérienne est la moins prononcée (fortes doses nécessaires).

Dans l'optique d'une lutte contre *Ralstonia solanacearum*, l'existence de ce potentiel stimulant pour de faibles concentrations d'extrait représente un risque de multiplication du pathogène. Il semble donc plus judicieux de choisir comme plantes de services celles dont les extraits non seulement ont le plus fort potentiel bactériostatique et bactéricide, mais aussi qui ne présentent pas de potentiel multiplicateur élevé.

Au vu de nos résultats sur le comportement antibactérien vis à vis de *Ralstonia solanacearum*, les cinq plantes les plus intéressantes seraient, dans l'ordre décroissant d'intérêt, le ricin (*Ricinus communis*), les deux *Raphanus sativus* cv. 9713 et cv. Karakter, et les deux *Mucuna deeringiana* (origine Brésil et Singapour).

B) Quelles utilisations agronomiques envisageables ?

1 - Généralités sur l'exploitation des effets allélopathiques

L'effet antibactérien des extraits végétaux que nous avons montré offre divers champs d'application possible :

- **Biopesticides** : L'utilisation d'extraits végétaux en tant que biopesticides a donné des résultats favorables.
- **Associations et rotations culturales** : l'effet allélopathique peut être exprimé par la plante de service au cours de la phase d'enfouissement, lors de la décomposition des tissus végétaux. Les propriétés bactéricides des extraits vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum* peuvent ainsi être exploitées dans le cadre l'introduction d'associations ou de rotations culturales avec enfouissement de la plante de service ; ce sont ces options qui nous intéressent dans le cadre du projet ATP OMEGA³.

2 - Stratégies envisageables pour les 5 plantes dégagées

- Les *Mucuna deeringiana* : Leurs propriétés antibactériennes vis-à-vis de *R. solanacearum* ne sont pas très fortes, elles présentent de plus un léger potentiel stimulateur. Cependant, il s'agit de légumineuses. Leur utilisation en plantes de rotation avec enfouissement apporterait ainsi un double intérêt : lutte modérée contre *R. solanacearum* et enrichissement azoté du sol.
- Les *Raphanus sativus* : Pour de fortes doses, leur propriétés antibactériennes vis-à-vis de *R. solanacearum* sont très intéressantes. Cet effet est probablement dû aux isothiocyanates, composés biocides communs aux plantes de la famille des crucifères, couramment utilisées pour la biofumigation. Leur utilisation comme plante de rotation avec enfouissement pourrait être une piste efficace de lutte contre *R. solanacearum*.
- *Ricinus communis* : Dès de faibles doses, le ricin est très efficace contre *R. solanacearum*. Les feuilles de cet arbuste pourraient ainsi fournir un amendement exogène efficace pour lutter contre le flétrissement bactérien.

C) Limites de l'étude et perspectives de recherches

Les résultats trouvés *in vitro* demandent bien entendu à être validés *in vivo*, par des études bactériologiques et agronomiques en serre et en champ. Les comportements antimicrobiens dégagés peuvent également s'avérer dangereux pour l'équilibre des sols s'ils ne sont pas suffisamment spécifiques à *Ralstonia solanacearum* : la fragilisation de l'écosystème du sol par réduction de la biomasse microbienne pourrait amener à l'invasion de la niche par d'autres pathogènes.

Afin de compléter cette étude, nous pourrions donc envisager d'évaluer les effets de chaque extrait efficace contre *Ralstonia solanacearum* sur la biomasse bactérienne du sol.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous avons vu que le flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* est une maladie particulièrement préoccupante pour le secteur maraîcher martiniquais, et que les méthodes employées pour lutter contre cette maladie ne suffisent pas encore à la contenir durablement. C'est ainsi que le laboratoire de phytopathologie du Cirad-PRAM de la Martinique s'est engagé dans une nouvelle piste de recherches : l'introduction de plantes de services assainissantes.

Les deux études réalisées au cours de ce stage nous ont en effet permis de mettre en évidence une action assainissante de certaines plantes contre *Ralstonia solanacearum* :

- L'évaluation en chambre climatique d'un lot d'espèces candidates sur le critère du statut hôte / non hôte et sur celui de la multiplication de la bactérie dans le sol rhizosphérique a mis en lumière les propriétés d'*Allium fistulosum* (oignon peyi), qui est non hôte et qui diminue la multiplication de *R. solanacearum* par rapport à un sol laissé nu. *Tagetes patula* (Œillet d'Inde) et *Raphanus sativus* cv. 9713, bien qu'hôtes à faible densité, ne multiplient pas la bactérie dans le sol rhizosphérique, et restent à ce titre intéressants. *Raphanus sativus* cv. Karakter est également hôte à faible densité, mais il multiplie la bactérie dans le sol.
- L'évaluation *in vitro* du potentiel antimicrobien d'un autre lot d'espèces végétales vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum* nous a quant à elle permis de dégager l'extrait de *Ricinus communis* (le ricin) comme le plus actif dès de faibles concentrations. Les *Raphanus sativus* cv. 9713 et Karakter (Raiforts) sont également très actifs, si la concentration en extrait est suffisamment élevée. Deux *Mucuna deeringiana* (origines Brésil et Singapour) montrent également un potentiel antibactérien moyen vis-à-vis de *R. solanacearum*.

La combinaison de ces résultats permet de dégager les deux *Raphanus sativus*, avec toutefois une préférence pour le cultivar 9713. Leur utilisation pour la biofumigation semble à ce stade judicieuse. L'œillet d'Inde (*Tagetes patula*) et l'oignon peyi (*Allium fistulosum*) peuvent également permettre des rotations et des associations intéressantes, avec comme atout principal pour l'oignon peyi sa bonne valeur marchande en Martinique.

Le ricin s'avère également une bonne piste de recherche : l'utilisation en apport exogène de parties vertes de cet arbuste (feuilles, pétioles) pourrait être assainissante. Cependant, la forte toxicité du ricin pourrait s'exprimer également vis-à-vis de la biomasse utile du sol, auquel cas son utilisation serait synonyme de déséquilibre de l'agrosystème. Il est donc impératif de tester la spécificité de l'important effet antibactérien du ricin vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum*.

Malheureusement, peu d'espèces ont été testées simultanément ces deux études, et nous n'avons par exemple pas pu évaluer les extraits d'*Allium fistulosum* et *Tagetes patula*. Le criblage des extraits aqueux végétaux est une manipulation donnant des résultats rapides, et va ainsi être continué par l'équipe, sur les extraits lyophilisés et sur des extraits crus préparés cette fois directement par le laboratoire de phytopathologie du Cirad-PRAM. Une confirmation des résultats de l'étude menée en chambre climatique pourra également être effectuée, et les autres espèces candidates seront également évaluées sur le statut hôte / non hôte.

Par la suite, il serait important de s'intéresser directement à la suppressivité du sol soumis aux différentes plantes candidates, vis-à-vis du flétrissement bactérien : la transplantation de tomates dans un sol soumis à chaque espèce testée fournira des informations nécessaires sur les effets de l'utilisation de chaque plante candidate. L'expérimentation en serre puis en champ des associations et rotations pourra également apporter des éléments de réponse sur l'utilisation agricole de ces plantes de services candidates.



BIBLIOGRAPHIE ET ANNEXES

TABLE DES ANNEXES

ICONOGRAPHIE	38
---------------------	-----------

BIBLIOGRAPHIE	39
----------------------	-----------

Techniques de laboratoire

ANNEXE 1 - MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS	41
---	-----------

ANNEXE 2 - TECHNIQUES BACTÉRIOLOGIQUES UTILISÉES	42
---	-----------

Évaluation du statut hôte / non hôte et multiplication dans le sol

ANNEXE 3 - PLAN DU DISPOSITIF	43
--------------------------------------	-----------

ANNEXE 4 - SOL RHIZOSPHERIQUE : ANALYSE STATISTIQUE	44
--	-----------

ANNEXE 5 - -TIGE ET RACINE : ANALYSE STATISTIQUE	46
---	-----------

Évaluation du potentiel antibactérien d'extraits aqueux végétaux

ANNEXE 6 - LISTE DES EXTRAITS VÉGÉTAUX	48
---	-----------

ANNEXE 7 - PROTOCOLE DE MANIPULATION	50
---	-----------

ANNEXE 8 - FICHE DE MANIPULATION	52
---	-----------

ANNEXE 9 - COURBES DE SURVIE	53
-------------------------------------	-----------

ICONOGRAPHIE

Sauf mention contraire dans la légende, les images présentées dans ce rapport sont de ma réalisation (Photographies numériques ; schémas réalisés sous Microsoft Word ou Inkscape).

BIBLIOGRAPHIE

ABO-ELYOUSR K. A. M. et ASRAN M. R. « Antibacterial activity of certain plant extracts against bacterial wilt of tomato ». *Archive of phytopathology and plant protection*, juin 2009, 42(6) : 573 - 578

ALVAREZ B., VASSE J., LE-COURTOIS V., TRIGALET-DÉMERY D., LÓPEZ M. M., TRIGALET A. « Comparative Behavior of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 in Diverse Plant Species » *Phytopathology*, 2008; 98(1):59-68

BALESTRA G.M., HEYDARI A., CECCARELLI D., OVIDI E., et QUATTRUCCIA. « Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens » 2009, *Crop protection*, vol 28 (10) : 807 - 811

CARDOSO S. C., SOARES A. C. F., LARANJEIRA F. F., LEDO C. A. S. et SANTOS A.P., « Control of tomato bacterial wilt through the incorporation of aerial part of pigeon pea and *Crotalaria* to soil » *Summa phytopathologica*, 2006, vol. 32, 27-33

COWAN M. M. « Plant products as antimicrobial agents », *Clinical Microbiology Reviews*, oct. 1999 : 564 - 582

CURTIS H., NOLL U., STÖRMANN J. et SLUSARENKO A. J. « Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes » 2004, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 65 : 79 - 89

EL-ARIQI S. N. S., EL-MOFLEHI M., EL ABARA K., EL KOBATI et EL-SHAARI A. « Antibacterial activity of extracts from *Withania somnifera* and *Aloe vera* against *Ralstonia solanacearum* in potato » 2005, *Arab Journal of Plant Protection*, 23 : 95-99

FRENCH E. R., « integrated control of bacterial wilt of potato », *Centro Internacional de la Papa*, 1997, section 3

HAYWARD A. C., « Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* », *Annual review phytopathology*, 1991

JOURAND P., RAPIOR S., FARGETTE M. et MATEILLE T. « Nemostatic effect of a leaf extract from *Crotalaria virgulata* subsp. *grantiana* on *Meloidogyne incognita* and its use to protect tomato roots ». *Nematology*, 2004, vol. 6(1) : 79 - 84

JOURAND P., RAPIOR S., FARGETTE M. et MATEILLE T. « Nemostatic activity of aqueous extracts of West African *Crotalaria* species ». *Nematology*, 2004, vol 6(5), 765-771

KABLAN B. J., ADIKO M. et ABROGOUA D. P. « Evaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies de Côte d'Ivoire ». *Phytothérapie*, 2008 : 282 - 288

LIRIO L. G., HERMANO M. L. et FONTANILLA M. Q. « Antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines ». *Pharmaceutical Biology*, 1998, vol. 36, N°5 : 357 - 359

LORIMER S. D., PERRY N. B., FOSTER L. M., BURGESS E. J., DOUCH P. G. C. , HAMILTON M. C., DONAGHY M. J. et MCGREGOR R. A. « A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products » 1996, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 44 : 2842 - 2845

MICHEL V., AHMED H. et DUTHEIL A., « La biofumigation, une méthode de lutte contre les maladies du sol » *Revue suisse Vitic. Arboric. Hort.*, 2007, Vol. 39 (2) : 145-150

de MORAIS L. A. S., do CARMO M. G. F., VIEGAS E. C., TEIXEIRA D. F., BARRETO A. S., PIZARRO A. P. B. et GILBERT B. « Evaluation of antimicrobial activity of extracts of medicinal plants on three tomato phytopathogens » 2002, *Acta Hort. (ISHS)* 569 : 87-90

MOROH J.-L. A., BAH C., DJE K., LOUKOU Y. G. et GUEDE-GUINA F. « Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiacae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli* ». *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 2008 : 44 - 61

QUATTRUCCI A. et BALESTRA G. M., « Antibacterial activity of natural extracts in *Pseudomonas syringae* pv. tomato control ». *Acta Hort. (ISHS)*, 2009, 808 : 339-342

SOUZA C., KOUMAGLO K. et GBEASSOR M. « Évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de quelques plantes médicinales ». *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 1995, 103-112

TERBLANCHE J. D. et DE VILLIER, « Suppression de *Ralstonia solanacearum* par l'œillet d'Inde ». 1998

TERBLANCHE J. D. « Biological control of bacterial wilt in tobacco caused by *Ralstonia solanacearum* », Master of science in agriculture, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa, 2007

WICKER E., GRASSART L., CORANSON-BEAUDU R., MIAN D., GUILBAUD C. et GRIOR P. « Emerging strains of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies) : a case study for epidemiology of bacterial wilt » 2005, *Acta Hort (ISHS)* 695

Pour le premier chapitre, j'ai de plus exploité les données de :

- La banque en ligne AGRESTE : statistiques annuelles
- Rapport

ANNEXE 1 – MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS

Composition des milieux de culture, pour un volume égal à 1 litre.

	Milieu solide	Milieu liquide
Milieux non sélectifs	GÉLOSE CPG <ul style="list-style-type: none"> • Bactopeptone : 10 g • Glucose : 5 g • Casamino acides : 1 g • Extrait de levure : 1 g • Agar : 15 g 	BOUILLON GPG <ul style="list-style-type: none"> • Bactopeptone : 10 g • Glucose : 5 g • Casamino acides : 1 g • Extrait de levure : 1 g • AGAR : 15 G
	MILIEU KELMAN MODIFIÉ <ul style="list-style-type: none"> • Casamino acides : 1 g • Bactopeptone : 10 g • Glycérol : 5 mL • Agar : 15 g • TTC à 1 % : 5 mL 	
Milieu semi-sélectif	GÉLOSE SMSA <ul style="list-style-type: none"> • Casamino acides : 1 g • Bactopeptone : 10 g • Glycérol : 5 mL • Agar : 17 g • TTC à 1 % : 1 mL <u>Antibiotiques :</u> <ul style="list-style-type: none"> • Cristal violet à 1 % : 0,05 mL • Polymyxine B Sulfate à 1 % : 10 mL • Bacitracine à 1% : 2,5 mL • Chloramphenicol à 1 % : 0,5 mL • Pénicilline G à 0,01 % : 0,5 mL 	

ANNEXE 2 – TECHNIQUES BACTÉRIOLOGIQUES UTILISÉES

A) Titrage de *R. solanacearum* au spectrophotomètre

- **Mise en solution d'une culture de *Ralstonia solanacearum*** : dans de l'eau distillée stérile
- **Dilution au 1/50ème** : dans de l'eau distillée stérile
- **Mesure d'absorbance** : au spectrophotomètre, à 600 nm (zéro à l'eau distillée stérile)
- **Calcul de la dilution à effectuer** : Grâce à la régression cfu = fonction (absorbance)
- Effectuer la dilution dans de l'eau distillée stérile

Schéma 1 : réalisation

B) Étalement en 3 secteurs

- **Réalisation** (schéma 1)
 - On étale une ose (1 ou 10µL) sur 1/3 de la boîte (1er secteur)
 - On reprend un peu sur le 1er secteur pour étaler un 2ème secteur
 - On reprend un peu sur le 2ème secteur pour étaler le 3ème.
- **Intérêt** (figure 28)

Cette technique d'étalement permet de bien séparer les différentes colonies, et ainsi de repérer une bactérie particulière (contamination d'une culture pure, détection de *R. solanacearum*).

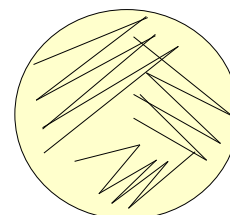
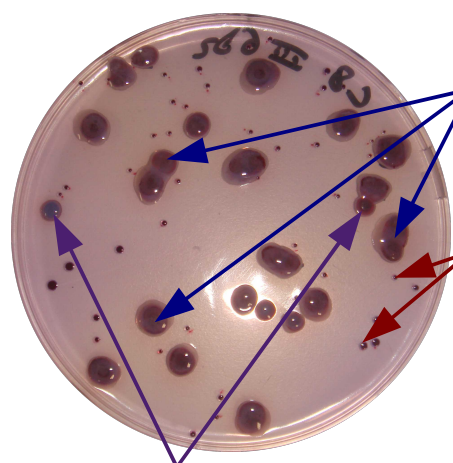


Figure 28: Aspect après 24h de culture

C) Détection de *Ralstonia solanacearum*

Nous avons pour la plupart des colonies déterminé à l'œil nu s'il s'agissait de *Ralstonia solanacearum*. Selon les boîtes, les morphotypes adoptés par la *R. solanacearum* étaient facilement reconnaissables ou non. La figure 3 montre par exemple une boîte faiblement chargée, pour laquelle les colonies sont d'un morphotype très typique. La figure 4 montre au contraire une boîte assez chargée, sur laquelle la bactérie peut apparaître sous des formes moins faciles à repérer.



Colonies de *R. solanacearum*:
muqueuse, rouge au centre et rose-gris à l'extérieure. Les colonies proches sont très jointives, ce qui peut mener à une sous-estimation

Colonies n'étant clairement pas du *R. solanacearum*:
toutes petites, sèches et rondes, ces colonies peuvent facilement être écartées.

Colonies pouvant porter à confusion : cependant, celle de gauche est trop blanche, et celle de droite est trop sèche pour qu'il s'agisse de *R. solanacearum*. En cas de doute, nous repiquons sur CPG pour trancher.

Figure 30: Boîte de Petri faiblement chargée, permettant un comptage aisé

Colonies de *R. solanacearum*:
sur des boîtes chargées, les colonies ressortent souvent plus petites et plus sèches

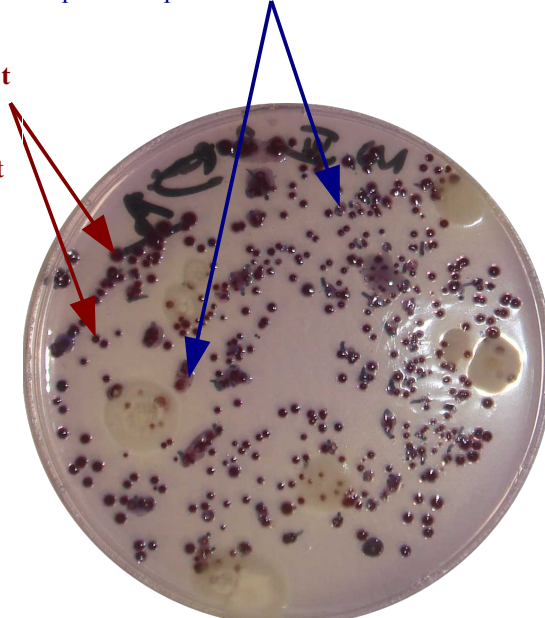


Figure 29: Boîte de Petri très chargée en colonies

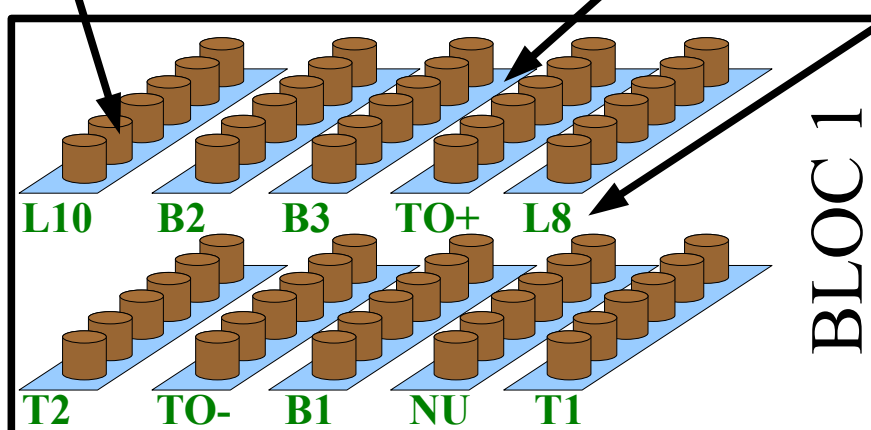
ANNEXE 3 – STATUT HÔTE / NON HÔTE : PLAN DU DISPOSITIF

Le dispositif est un dispositif orthogonal en blocs complets :

- **3 blocs** : sur 3 étagères à 2 étages, dans la même chambre climatique
- **10 traitements** : Répartis aléatoirement au sein de chaque bloc
- **6 pots par traitement et par bloc** : placés sur une même coupelle d'irrigation
=> Soit donc un total de 18 pots par traitement.

POT (=observation)
regroupant un
nombre variable de
plants

COUPELLE D'IRRIGATION
reliant les 6 pots d'un même
traitement et d'un même bloc



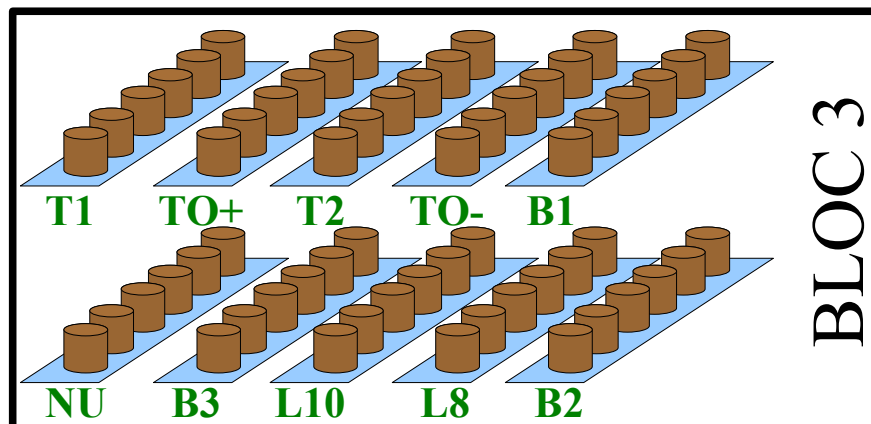
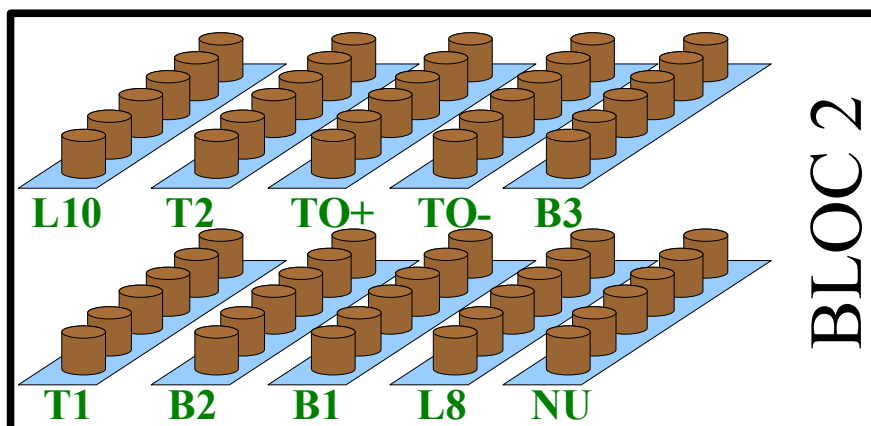
10 TRAITEMENTS
par bloc, répartis
aléatoirement

7 Traitements plantes candidates

- B1 : *Raphanus s.* cv 9713
- B2 : *Raphanus s.* cv Karakter
- B3 : *Allium fistulosum*
- L8 : *Macroptilium a.* cv Aztec
- L10 : *Vigna u.* cv Ebony
- T1 : *Tagetes patula*
- T2 : *Tagetes erecta*

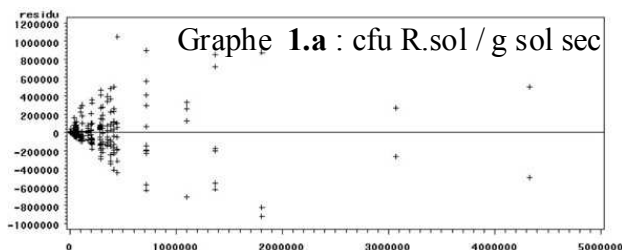
3 Traitements témoins

- TO- : *Solanum l.* **non** inoculée
- TO+ : *Solanum l.* **inoculée**
- NU : Sol nu **inoculé**



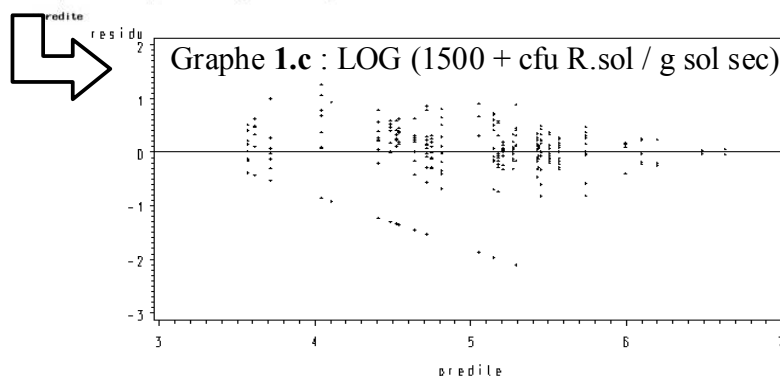
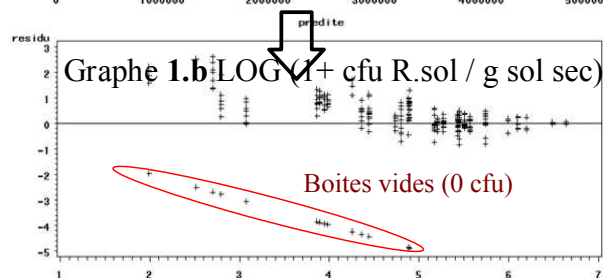
ANNEXE 4 – SOL RHIZOSPHERIQUE : ANALYSE STATISTIQUE

A) Analyse des résidus



Nous avons effectué une ANOVA à 2 facteurs sur le nombre de colonies (cfu) rapporté à la masse de sol sec : cfu R.sol / g sol sec. Le graphe des résidus montrant une augmentation de la variabilité avec la valeur prédite (hypothèse d'homoscédasticité non vérifiée), nous avons opté pour une transformation logarithmique.

Cependant, là encore le graphe des résidus obtenus n'était pas satisfaisant : les résidus correspondant aux boîtes vides (sur lesquelles aucune colonie de *R. solanacearum* n'a été comptée) se détachaient trop du reste des valeurs. Nous avons donc effectué la transformation LOG (1500 + cfu R.sol / g sol sec) afin que les valeurs 0 soient moins éloignées.



Le graphe obtenu (1.C) est cette fois satisfaisant, on n'observe plus de structure trop particulière.

B) ANOVA sur LOG (1500 + cfu / g sol sec)

Test du modèle

Source	DF	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Model	26	131.5612892	5.0600496	17.10	<.0001
Error	231	68.3539740	0.2959046		
Corrected Total	257	199.9152632			

R-carré	Coeff Var	Racine MSE	log2cfuperss Moyenne
0.658085	11.25939	0.543971	4.831265

- Le modèle est significatif ($P_c < 0,001$), et a un bon ajustement (R-carré = 0,66).
- Le coefficient de variation indique que la dispersion est importante (11). Elle a cependant fortement été réduite grâce à transformation : le coefficient de variation était de 78 avant le passage au logarithme.

Création de groupes statistiques par le test SNK

SNK Groupement	Moyenne	Nb	TRAIT
A	6.2753	8	Sol ToM +
B	5.9218	22	Sol T2
C	5.4380	36	Sol L8
C	5.1988	36	Sol B2
C	5.0520	14	Sol ToV +
D	4.6973	34	Sol B1
D	4.6221	36	Sol Nu
D	4.3209	36	Sol T1
E	3.6300	36	Sol B3

Les moyennes précédées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (à 5%).

C) Programme SAS

Ci dessous le programme SAS pour l'ANOVA sur **LOG (1500 + cfu / g sol sec)**. Les programmes réalisés pour l'étude de **cfu / g sol sec** et de **LOG (1 + cfu / g sol sec)** sont similaires.

```
/*On efface les sorties*/
dm'clear log'; dm 'clear output';
run;

ods rtf file="anova sol bloc log (1500+RS per sol sec)" ;

/*Importation des données*/
proc sort data = sasuser.solpds2 out = donnees;
  by trait bloc;
run;

proc sort data = sasuser.solpds2 out = donnees2;
  by trait;
run;

/*Statistiques élémentaires*/
proc means data = donnees2 mean min max std;
  by trait;
  var Rsola cfuperss logcfuperss log1500cfuperss;
  output out = statelem mean = Rsola cfuperss logcfuperss log1500cfuperss;
  title 'resumés numériques sol log1500 PdS2';
run;
Proc print data =statelem;
run;

/*Analyse de la variance avec interaction*/
proc glm data= donnees2;
  class trait bloc;
  model log1500cfuperss = trait bloc trait*bloc;
  means trait/ snk;
  output out = residus p = predite r = residu;
run;

/*Analyse des résidus*/
symbol i=none v=plus;
proc gplot data = residus;
  plot residu * predite / vref = 0;
run;

ods rtf close;
quit;
```

ANNEXE 5 – TIGE ET RACINE : ANALYSE STATISTIQUE

Nous avons choisi de traiter simultanément tiges et racines, d'où un total de $2 \times 8 = 16$ traitements.

A) Analyse des résidus

L'analyse des résidus nous a là encore conduits à réaliser la transformation logarithmique suivante : $\text{LOG} (1500 + \text{cfu} / \text{g mat. fraîche})$

B) ANOVA sur LOG (1500 + cfu / g mat. fraîche)

- Test du modèle -

Source	DF	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
Model	47	137.1531974	2.9181531	13.11	<.0001
Error	416	92.6066734	0.2226122		
Corrected Total	463	229.7598708			

R-carré	Coeff Var	Racine MSE	log2cfuperss Moyenne
0.596941	13.43965	0.471818	3.510641

Source	DF	Type I SS	Carré moyen	Valeur F	Pr > F
TRAIT	15	98.91499672	6.59433311	29.62	<.0001
BLOC	2	0.43608361	0.21804181	0.98	0.3764
TRAIT*BLOC	30	37.80211707	1.26007057	5.66	<.0001

Le modèle est bien significatif, et a un assez bon ajustement (R-carré).

- Création de groupes statistiques par SNK -

SNK Groupement	Moyenne	Nb	TRAIT
A	4.9965	22	Racine T2
B	4.4192	14	Racine TO +
C	4.1211	36	Racine L8
D	3.7850	14	Tige TO +
D	3.7558	22	Tige T2
D E	3.5559	34	Tige B1
D E	3.4555	34	Racine B1
D E	3.4347	36	Racine B2
E	3.3775	36	Racine T1
E	3.2230	36	Tige T1
E	3.2197	36	Tige L8
E	3.1830	36	Tige B2
E	3.1761	36	Racine B3
E	3.1761	18	Racine TO -
E	3.1761	36	Tige B3
E	3.1761	18	Tige TO -

Les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (à 5%). Nous nous sommes inspiré de ce classement pour réaliser les classes détaillées dans la partie Matériels & Méthodes

D) Programme SAS

Ci dessous le programme SAS pour l'ANOVA sur **LOG (1500 + cfu / g matière fraîche)**. Les programmes réalisés pour l'étude de **cfu / g matière fraîche** et de **LOG (1 + cfu / g matière fraîche)** sont similaires.

```

/*On efface les sorties*/
dm'clear log'; dm 'clear output';
run;

ods rtf file="anova plante bloc log (1500+RS per matière fraiche)" ;

/*Importation des données*/
proc sort data = sasuser.plantepds2 out = donnees;
  by trait;
run;

/*Statistiques élémentaires*/
proc means data = donnees mean min max std;
  by trait;
  var RSperMF logRS1perMF log1500RSperMF;
  output out = statelem mean = RSperMF logRS1perMF log1500RSperMF;
  title 'résumés numériques plante log1500 PdS2';
run;
Proc print data =statelem;
run;

/*Analyse de la variance avec interaction*/
proc glm data= donnees;
  class trait bloc;
  model log1500cfuperss = trait bloc trait*bloc;
  means trait/ snk;
  output out = residus p = predite r = residu;
run;

/*Analyse des résidus*/
symbol i=none v=plus;
proc gplot data = residus;
  plot residu * predite / vref = 0;
run;

ods rtf close;
quit;

```


ANNEXE 6 – LISTE DES EXTRAITS VÉGÉTAUX

Nom scientifique	Famille	Propriétés biocides	Intérêt agronomique
<i>Mucuna deeringiana</i> - or. Singapour	Légumineuse	Nématicide	Engrais vert
<i>Mucuna deeringiana</i> - or. Brésil	Légumineuse	Nématicide	Engrais vert
<i>Crotalaria spectabilis</i> - cv INRA	Légumineuse	Nématicide	Engrais vert
<i>Crotalaria juncea</i> - or. Inde	Légumineuse	Nématicide	Engrais vert
<i>Crotalaria</i> sp. - or. Neufchatel	Légumineuse	Nématicide	Engrais vert
<i>Canavalia ensiformis</i> - or. Brésil	Légumineuse	Nématicide	Engrais vert
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Légumineuse	Nématicide	Engrais vert
<i>Stylosanthes</i> - Brésil	Légumineuse	Nématicide	Engrais vert
<i>Raphanus sativus</i> cv. 9713 - Pays Bas	Brassicacée	Biofumigante	Brassicacée supportant le climat
<i>Raphanus sativus</i> cv. Karakter - Pays Bas	Brassicacée	Biofumigante	Brassicacée supportant le climat
<i>Azadirachta indica</i> (Neem) - feuilles	Euphorbiacée	Insectifuge	
<i>Azadirachta indica</i> (Neem) - graines	Meliaceae	Insectifuge	
<i>Ricinus communis</i> (Ricin)	Meliaceae	Insectifuge	
<i>Cymbopogon</i> sp. (Citronnelle)	Graminée	Insectifuge	
<i>Musa acuminata</i> (Bananier cv. Grande-Naine)	Musaceae		Culture économique

Tableau ci-dessous : poids de matière fraîche et volumes d'eau utilisés pour la préparation des extraits par Jean Michel RIZÈDE

	Matière fraîche (g)	Eau (mL)
<i>Mucuna deeringiana</i> - or. Singapour	357,5	719
<i>Mucuna deeringiana</i> - or. Brésil	168,5	770
<i>Crotalaria juncea</i> - or. Inde	40	300
<i>Crotalaria</i> sp. - or. Neufchatel	107	376
<i>Canavalia ensiformis</i> - or. Brésil	135	371,5
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	249	526
<i>Stylosanthes</i> - Brésil	168	772
<i>Crotalaria spectabilis</i> cv. Inra	87	583
<i>Raphanus sativus</i> cv. 9713 - Pays Bas	79	370
<i>Raphanus sativus</i> cv. Karakter - Pays Bas	80	386
<i>Azadirachta indica</i> (Neem) - feuilles	81,5	428
<i>Azadirachta indica</i> (Neem) - graines	134	332,5
<i>Ricinus communis</i> (Ricin)	105	358
<i>Cymbopogon</i> sp. (Citronnelle)	121	452
<i>Musa acuminata</i> (Bananier cv. Grande-Naine)	309	416

ANNEXE 7 – PROTOCOLE DE MANIPULATION

- Technique de macrodilution en milieu liquide - Protocole pour 1 réplicat sur 1 extrait aqueux végétal lyophilisé


*** Manipulation en conditions stériles ***

- l'eau, le milieu CPG liquide et le matériel (tubes, cônes...) sont préalablement stérilisés à l'autoclave : 20mn à 120°C
- le travail s'effectue sous hotte bactériologique

*** Matériel à préparer ***

- Eau distillée stérile (EDS)
- CPG modifié liquide stérile (de préparation récente)
- Cônes 100µL, 1000µL, et 5000µL
- 4 ou 5 piluliers 50µL
- 35 tubes eppendorf 1.5mL + une dizaine pour CMB
- 2 x 34 tubes à hémolyse 5mL (1^{ère} et 2^{nde} lectures)
- 2 x 35 cuves semi-micro (1^{ère} et 2^{nde} lectures)
- 10^{aine} de boîtes de Petri 90mm Kelman modifié
- 10^{aine} de boîtes de Petri 90mm SMSA modifié

*** Documents associés ***

- Protocole de titration de *R. solanacearum* et fichier calcul-inoculation.xls
- Instructions d'utilisation du spectrophotomètre
- Protocole de préparation des milieux de culture
- Le matériels et méthodes de l'expérience
- **La fiche de manipulation** (fiche-de-manipulation.pdf) : renseigner la fiche de manipulation aux étapes signalées par un crayon 
- Pour le calcul des taux et courbes de survie, reporter les résultats de la fiche de manipulation dans le fichier *n° de l'extrait*.xls (ex : 12.xls pour l'extrait n°12)

*** Abréviations et définitions ***

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice : concentration pour laquelle on calcule TauxDeSurvie < 5%

C_{0,01}% : Concentration pour laquelle on a moins de 0,01% de survie (à déterminer par comptages)



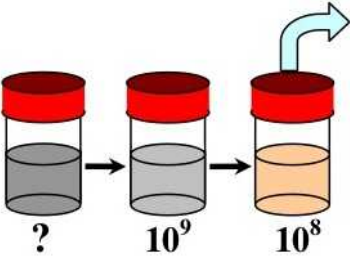
EDS : Eau Distillée Stérile

R.sol : *Ralstonia solanacearum*

cfu : Unité Formant une Colonie

S° : Solution

*** Réalisation ***

Extrait	<p>Dans un eppendorf 1,5mL :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peser 60 mg d'extrait aqueux végétal . <p>Ajouter 500µL d'EDS : D'où une solution mère d'extrait à 120 mg/mL</p> <p>Centrifuger quelques secondes s'il y a trop de bulles dans l'extrait</p> <ul style="list-style-type: none"> • Étaler une ose 1 µL sur gélose CPG pour tester la présence de contaminants 	<p> Rubrique : « Remise en suspension de l'extrait »</p> <p> Rubrique : « Remarques »</p>
Inoculum	<p>Dans des piluliers 50µL :</p> <p>LA VEILLE : Repiquer la souche 02.075 sur CPG</p> <p>LE JOUR MEME :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mettre en solution dans de l'EDS la culture de la veille, la titrer au spectrophotomètre (600nm) • Diluer dans le l'EDS pour obtenir une solution bactérienne à 10⁹cfu/mL (dilution obtenue sur calcul-inoculation.xls) • Diluer au 1/10^{ème} dans du CPG liquide pour obtenir l'inoculum à 10⁸cfu/mL 	 <p>9 mL CPG 1 mL solution bactérienne à 10⁹ =10mL inoculum CPG à 10⁸</p>

Préparation des gammes et dilution de l'extrait

PREPARATION DES TUBES

- Numéroter 34 tubes eppendorf 1.5mL comme indiqué sur le schéma ci-dessous : tubes 1+ à 15+ (gamme test), tubes 1- à 15- (gamme couleur), 3 T+ et 1 T- (témoins)

- Ajouter 100µL d'EDS sauf dans les tubes 1+ et 1-

PREPARATION DES TEMOINS T+ ET T- :

3 positifs et 1 négatif contenant chacun uniquement 100µL d'EDS

DILUTION AU ½ DE L'EXTRAIT

- Procéder à la dilution au ½ de la gamme test :
 - Ajouter 100µL de S° mère d'extrait dans le tube 2+
 - Dilution successive au ½ pour les tubes 3+ à 15+
 - Jeter les derniers 100µL du tube 15+
- Procéder de même pour la gamme couleur

➔ D'où deux gammes de 15 tubes (dont 14 tubes contenant 100µL et 1 vide)

Ajout du milieu de culture

GAMME COULEUR ET TEMOIN NEGATIF

- Ajouter dans chaque tube 300 µL de CPG liquide non inoculé
- Ajouter 100 µL de S° mère d'extrait à 120mg/mL dans le tube 1-

GAMME TEST ET TEMOINS POSITIFS

- Ajouter dans chaque tube 300 µL d'inoculum CPG inoculé à 10⁸cfu/mL
- Puis ajouter 100 µL de S° mère d'extrait à 120mg/mL dans le tube 1+

➔ D'où 4 témoins et deux gammes de 15 tubes contenant chacun 400µL.

Tubes + et -	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
[extrait] en mg/mL	30	15	7.5	3.75	1.875	0.94	0.47	0.23	0.12	0.059	0.029	0.015	0.0073	0.0037	0.0018

Lectures

LECTURE A T0 : JUSTE APRES LA PREPARATION DES TUBES

Dans des tubes à hémolysé 5mL (2x15 tubes + 4 tubes) :

- Dilution au 10^{ème} des deux gammes et des témoins (110µL + 990 µL d'EDS)
- ➔ Mettre les gammes et témoins (tubes eppendorf) à l'étuve à 28°C sous agitation (≈ 160 rpm)
- Lecture d'absorbance à 600nm (zéro à l'EDS) des dilutions au 10^{ème}

LECTURE A T24H : après 24h d'incubation, Répéter l'opération

C_{0.01} %

DENOMBREMENT TEMOIN + A 24H APRES INCUBATION

- Dans 6 eppendorf : 6 Dilutions successives au 1/10^{ème} du tube T+ (50µL dans 450µL d'eau d.s.)
- Étaler 50µL de la dilution 10⁻⁶ sur 2 boîtes de Petri 90mm (1 SMSA et 1 Kelman)

DENOMBREMENT TUBES + A 24H

- Dans des eppendorf 1,5mL : Préparer une dilution au 1000^{ème} des tubes : du tube 1+ au 1^{er} tube plus concentré que la CMI (cf courbe de survie)
- étaier 50µL de chaque sur 2 boîtes de Petri (1 SMSA et 1 Kelman)

24H A 72H PLUS TARD : LECTURE

- Dénombrer les cfu de R.sol. dans chaque boîte
- Encadrer la valeur de la CMB en comparant chaque boîte avec celles de la dilution 10⁻⁶ de l'inoculum initial (cf CMB étape 1)

ANNEXE 8 – EXTRAITS VÉGÉTAUX : FICHE DE MANIPULATION

DATE DE LANCEMENT

EXTRAIT N°

Remise en suspension de l'extrait

Solubilité :	Matières en suspension ?
Viscosité :	Couleur :

Remarques :

- Lectures d'absorbance : CMI -

TÉMOINS POSITIFS

Initial			
Final			

NEGATIF

Mise à l'étuve à :	Sortie de l'étuve à :
--------------------	-----------------------

GAMME TEST (+)

Tube N°	1 +	2 +	3 +	4 +	5 +	6 +	7 +	8 +	9 +	10 +	11 +	12 +	13 +	14 +	15 +
Initial															
Final															

GAMME TÉMOIN COULEUR (-)

Tube N°	1 -	2 -	3 -	4 -	5 -	6 -	7 -	8 -	9 -	10 -	11 -	12 -	13 -	14 -	15 -
Initial															
Final															

Remarques :

Remarques :

- Dénombrement : C_{0,01%} -

	Tube N°									
SMSA	cfu/boite									
KELMAN	cfu/boite									

	T+ D6	T+ D7	T+D8
SMSA			
KELMAN			

CLASSEMENT :

Dilution :

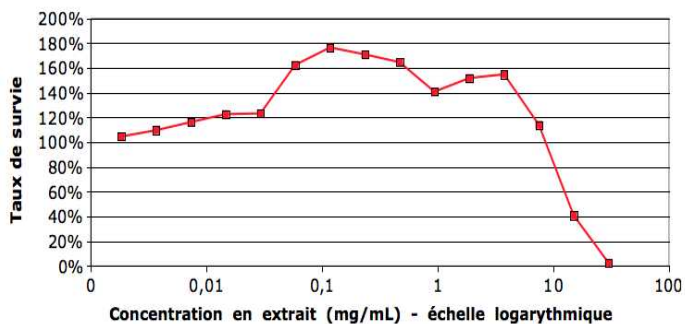
Volume étalé :

ENCADREMENT DE LA C_{0,01%}

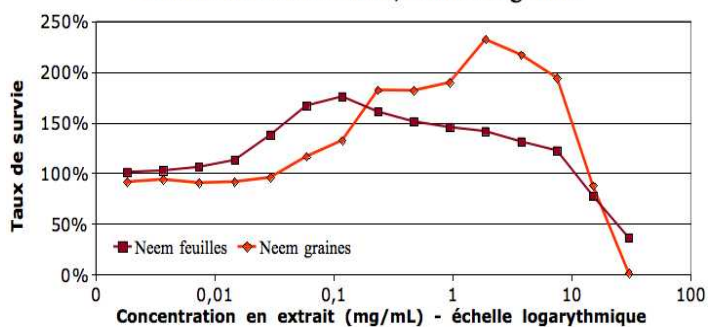
ANNEXE 9 – COURBES DE SURVIE

Les courbes de survie des extraits végétaux ayant un effet stimulant sur la croissance de *Ralstonia solanacearum* sont données ci-dessous.

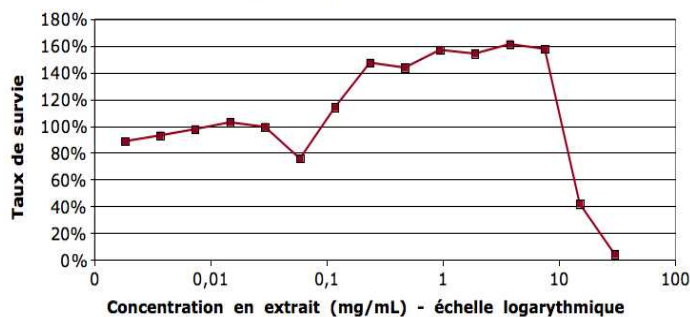
Courbes de survie : Bananier



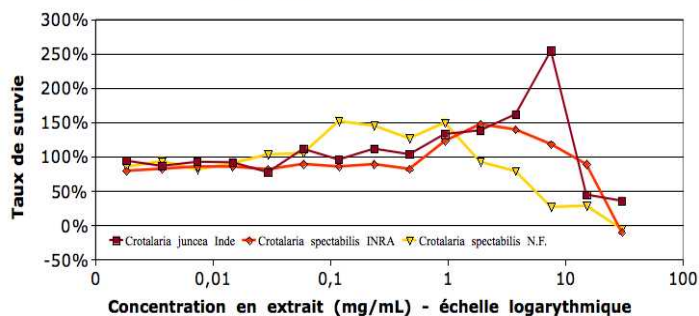
Courbe de survie : Neem, feuilles et graines



Courbe de survie : Canavalia ensiformis



Courbes de survie : Crotalaria



Courbe de survie : Stylosanthes

